



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112694535 A

(43) 申请公布日 2021.04.23

(21) 申请号 202110016645.4

(22) 申请日 2021.01.05

(71) 申请人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路1号

(72) 发明人 胡接力 黄爱龙 李杰

(74) 专利代理机构 成都高远知识产权代理事务
所(普通合伙) 51222

代理人 李高峡 张娟

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

G12N 9/02 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

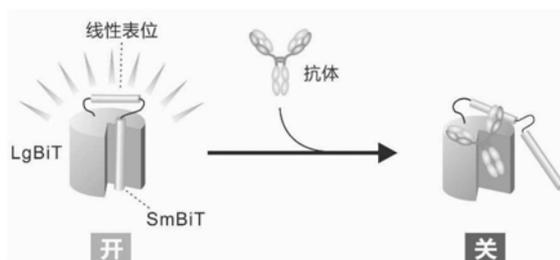
序列表6页 附图3页

(54) 发明名称

用于抗体检测的多功能蛋白分子开关

(57) 摘要

本发明公开了一种用于抗体检测的多功能蛋白分子开关,属于蛋白检测领域,所述分子开关为融合蛋白,从N端到C端,包括依次连接的如下部分:(1) SmBiT;(2) 抗原表位多肽,可被待检测抗体特异性结合;(3) LgBiT。本发明的分子开关可通过抗原表位多肽与抗体特异性识别,影响SmBiT和LgBiT的结合,极大改变荧光素酶活性,导致前后荧光素酶活性变化,该变化可反映抗体浓度的高低。将本发明的分子开关用于检测新冠病毒,准确性和特异性均接近100%,具有十分良好的应用价值。



1. 一种用于抗体检测的多功能蛋白分子开关,其特征在于:所述分子开关为融合蛋白,从N端到C端,包括依次连接的如下部分:
 - (1) SmBiT;
 - (2) 待检抗体的抗原表位多肽;
 - (3) LgBiT.
2. 如权利要求1所述的分子开关,其特征在于:所述部分(1)的N端一侧和/或部分(3)的C端一侧还有一段抗原表位多肽,该抗原表位多肽可被待检测抗体特异性结合。
3. 如权利要求1或2所述的分子开关,其特征在于:所述部分(1)和(2)之间包括连接序列。
4. 如权利要求3所述的分子开关,其特征在于:所述连接序列为表达融合蛋白所用的柔性接头,优选地,所述连接序列为GS linker。
5. 如权利要求1或2所述的分子开关,其特征在于:所述抗原表位多肽是Flag标签;优选地,所述部分(1)和(2)之间包括连接序列;进一步优选地,所述连接序列为表达融合蛋白所用的柔性接头;更进一步优选地,所述连接序列为GS linker。
6. 如权利要求1或2所述的分子开关,其特征在于:所述抗原表位多肽是pG4多肽;优选地,所述部分(1)和(2)之间包括连接序列;进一步优选地,所述连接序列为表达融合蛋白所用的柔性接头;更进一步优选地,所述连接序列为GS linker。
7. 如权利要求1或2所述的分子开关,其特征在于:所述抗原表位多肽是p21多肽;优选地,所述部分(1)和(2)之间包括连接序列;进一步优选地,所述连接序列为表达融合蛋白所用的柔性接头;更进一步优选地,所述连接序列为GS linker。
8. 权利要求1~7任一所述的分子开关在用于检测抗体中的用途。
9. 一种检测新冠病毒的试剂盒,其特征在于:其包括权利要求6或7所述的分子开关。
10. 如权利要求9所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括检测Nanoluc荧光素酶活性的试剂。

用于抗体检测的多功能蛋白分子开关

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白检测领域。

背景技术

[0002] 蛋白分子开关是一种可用于检测各种目标生物分子的生物传感器,其原理是利用经过特别设计的蛋白分子,在结合目标分子前后的不同构象和功能状态,来“感知”和反映目标分子的存在,从而达到检测目的。蛋白分子开关在疾病诊断、生物学基础研究方面有广泛用途。蛋白分子开关设计的最新进展,以2020年度科学突破奖得主David Baker的工作为代表。他们设计构建了一种人工合成的蛋白分子开关LOCKR (Naure, 2019),然后将该系统用于生物信号调控 (Nature, 2019),新近又用于新冠病毒抗体和抗原检测 (BioRxiv, 2020)。

[0003] 变构调节酶常被用来作为分子开关的设计基础,用于检测各种蛋白分子,包括针对病毒产生的抗体等。这里的变构调节酶,是指那些酶活性会因为某些构象变化而发生改变的酶。当目标分子尚未结合到酶分子时,酶分子处于活性较低(或较高)的状态,当目标分子结合到酶分子以后,改变了酶分子的空间结构,从而使酶活性发生变化(变高或者变低)。此时,酶活性的变化即可反映目标分子的存在及其数量。利用变构调节酶检测目标分子的好处,是目标分子的结合与信号输出发生在同一个分子上,二者的紧密偶联有助于保证检测的高度特异性,因而可以去除反复洗涤和更换缓冲液等诸多步骤,极大简化检测流程。利用相似的原理,荧光蛋白也常用于分子开关设计,只不过此时的输出信号为荧光而非酶活性。

[0004] 蛋白分子开关的思想由来已久,但其应用较好的方面主要是检测小分子,比如利用荧光蛋白、钙调蛋白(CaM)以及钙调蛋白结合肽(CaM-BP)构建的分子开关来检测钙离子。经过近20年迭代改进,这类分子开关目前已经能达到很好的检测效果。又如利用 β 内酰胺酶(BLA)、麦芽糖结合蛋白(MBP)构建的分子开关,可以有效地检测麦芽糖。然而,与这些小分子相比,用蛋白分子开关检测生物大分子的效果却不尽人意。以研究较多的 β 半乳糖苷酶分子开关为例,源于手足口病病毒(FMDV)或HIV的多肽,分别被重组插入该酶的特定位置构建分子开关,即使经过充分优化,这些分子开关在用于血清样本检测时,患者血清与对照血清的信号差别,在最好情况下也没有超过5倍。前述David Baker等利用合成生物学手段,设计构建的人工分子开关,在分子开关的设计基础和路径方面提出了新思路,尽管他们据此设计优化的分子开关(LOCKR),在检测新冠病毒S蛋白时表现优良(信噪比14倍),但在检测新冠病毒抗体时(纯化的多抗),其信噪比也仅达到2倍。在检测乙肝病毒抗体时,信噪比最高达到约4倍(未用血清进行测试)。如果将这些分子开关用于真实临床样本检测,其检测信噪比(阳性样本与阴性样本的比值)将会更低,因为临床样本的成分更复杂,可变因素和干扰因素更多。总之,较小的信噪比,使得现有的分子开关难以真正用于临床检测。

[0005] Nanoluc荧光素酶是从一种深海虾类动物中分离到的荧光素酶,经过改造和优化后,具有迄今最强的发光活性(96孔板测量值可达 10^8),同时发光持续时间长,分子量小,这些特点十分有利于其在生物学中的应用。此外,Dixon等2015年的研究发现,Nanoluc羧基

末端长度为11个氨基酸(AA)的片段,可以与氨基末端的大片段(商品名LgBiT)分离开来。他们将这11AA片段进一步改造和进化,得到两个新的多肽,商品名称分别为SmBiT和HiBiT(Promega)。HiBiT与LgBiT之间具有高亲和力($K_d=0.7\text{nM}$),而SmBiT与LgBiT之间的亲和力很低($K_d=190\mu\text{M}$),当HiBiT或SmBiT与LgBiT分离时,各部分均没有酶活性,而当HiBiT或SmBiT与LgBiT靠近时,则恢复Nanoluc活性。

[0006] Triana等为了研究2个目标蛋白是否相互作用,将2个目标蛋白分别融合到SmBiT和LgBiT,当荧光素酶活性被激活时,表明这2个目标蛋白存在相互作用关系。Boursier等将HiBiT与G蛋白偶联受体(GPCR)融合表达于细胞膜,借此可检测膜表面受体密度;他们还利用了GPCR配体与荧光标志物都竞争性结合HiBiT-GPCR融合蛋白,以评估配体浓度。

[0007] 目前,尚未见将Nanoluc荧光素酶的不同片段用于检测抗体的报道。

发明内容

[0008] 本发明要解决的问题是:提供一种新的可用于检测抗体的多功能蛋白分子开关。

[0009] 本发明的技术方案如下:

[0010] 一种用于抗体检测的多功能蛋白分子开关,所述分子开关为融合蛋白,从N端到C端,包括依次连接的如下部分:

[0011] (1) SmBiT;

[0012] (2) 待检抗体的抗原表位多肽;

[0013] (3) LgBiT。

[0014] 进一步地,所述部分(1)的N端一侧和/或部分(3)的C端一侧还有一段抗原表位多肽,该抗原表位多肽可被待检测抗体特异性结合。

[0015] 进一步地,所述部分(1)和(2)之间包括连接序列。

[0016] 进一步地,所述连接序列为表达融合蛋白所用的柔性接头,优选地,所述连接序列为GS linker。

[0017] 进一步地,所述抗原表位多肽是Flag标签;

[0018] 优选地,所述部分(1)和(2)之间包括连接序列;

[0019] 进一步优选地,所述连接序列为表达融合蛋白所用的柔性接头;更进一步优选地,所述连接序列为GS linker。

[0020] 进一步地,所述抗原表位多肽是pG4多肽;

[0021] 优选地,所述部分(1)和(2)之间包括连接序列;

[0022] 进一步优选地,所述连接序列为表达融合蛋白所用的柔性接头;更进一步优选地,所述连接序列为GS linker。

[0023] 进一步地,所述抗原表位多肽是p21多肽;

[0024] 优选地,所述部分(1)和(2)之间包括连接序列;

[0025] 进一步优选地,所述连接序列为表达融合蛋白所用的柔性接头;更进一步优选地,所述连接序列为GS linker。

[0026] 前述的分子开关在用于检测抗体中的用途。

[0027] 一种检测新冠病毒的试剂盒,其包括前述的分子开关。

[0028] 进一步地,所述试剂盒还包括检测Nanoluc荧光素酶活性的试剂。

[0029] 本发明的基础设计的原理如图1所示。将LgBiT和SmBiT通过待检抗体的抗原表位多肽连接,SmBiT能进入LgBiT的特定位置,可产生荧光素酶活性;当目标抗体结合线性表位后,引起空间位阻和变构效应,影响SmBiT与LgBiT的结合强度(增强或削弱),荧光酶活性随之改变。加入荧光素酶底物即可通过荧光强弱变化来反映目标抗体的含量。

[0030] 本发明优选的设计是在图1的基础上,继续在SmBiT的N端一侧和/或LgBiT的C端一侧再加入待检抗体的抗原表位多肽,该设计可提高检测的信噪比。

[0031] 本发明的有益效果:

[0032] 1. 信噪比高。本发明的分子开关检测flag抗体的信噪比可达到30倍以上,检测新冠病毒抗体时的信噪比更能高达200倍以上。

[0033] 2. 特异性好。在无关抗体的干扰下,本发明的分子开关检测信号不会被影响,检测新冠病毒抗体的特异性达97.0%。

[0034] 3. 线性区间宽。在检测新冠病毒抗体时,血清稀释度512倍以内均表现出良好的线性,利于定量分析。

[0035] 4. 准确度高。在检测新冠病毒抗体时,准确度高达97.3%。

[0036] 显然,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和惯用手段,在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0037] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

附图说明

[0038] 图1:用于抗体检测的NanoSwitch分子开关原理。

[0039] 图2:用于Flag抗体检测的NanoSwitch设计与测试。A,结构和工作示意图;B,荧光酶活性变化倍数;C,Western blot鉴定图。

[0040] 图3:NanoSwitch-1×flag-2NM的检测特异性测试。A,与GAPDH抗体的特异性测试结果;B,3xflag多肽竞争性干扰测试结果。

[0041] 图4:用于新冠抗体检测的NanoSwitch筛选。

[0042] 图5:NanoSwitch-PG4/P21的多肽竞争抑制实验结果。

[0043] 图6:NanoSwitch-pG4的动态检测范围。

[0044] 图7:NanoSwitch-pG4用于检测新冠病毒抗体。

[0045] 图8:NanoSwitch-pG4正确反映新冠感染者的新冠抗体变化趋势。

具体实施方式

[0046] 实施例中所用试剂、材料来源如表1所示。

[0047] 表1试剂、材料来源

[0048]	试剂名称	生产公司
	IPTG	BBI
	硫酸卡那霉素	BBI
	咪唑	BBI
	NaCl	BBI
	KCl	BBI
	Na ₂ HPO ₄	BBI
	NaH ₂ PO ₄	BBI
	KH ₂ PO ₄	BBI
	ATP	NEB
	DTT	NEB
	T7 Ligase 连接酶	NEB
	BsmB I	Thermo Fisher Scientific
	10×buffer Tango	Thermo Fisher Scientific
[0049]	Lipofectamine 3000 转染试剂	Thermo Fisher Scientific
	胎牛血清	Gibico
	胶回收试剂盒	Magen
	PrimeSTAR Max Premix, 2×	TAKARA
	质粒小抽提取试剂盒	OMEGA
	琼脂糖	Diamond
	酵母提取物	Diamond
	蛋白胨	Diamond
	琼脂	Diamond
	浓盐酸	BBI
	氢氧化钠	BBI
	大肠杆菌 Rosetta(DE3)	Solarbio
	原核表达载体 pet28a	Solarbio
	HEK293 细胞	ATCC

[0050] 实施例中所用溶液配制方法:

[0051] LB液体培养基:胰蛋白胨2g,酵母提取物1g,NaCl 2g,溶于ddH₂O,定容至200ml,高温高压灭菌20min。

[0052] LB固体培养基:胰蛋白胨2g,酵母提取物1g,NaCl 2g,琼脂3g,溶于ddH₂O,定容至200ml,高温高压灭菌20min。

[0053] 硫酸卡那霉素溶液(50mg/ml):0.5g硫酸卡那霉素固体溶于10ml ddH₂O,0.45um滤膜过滤除菌。

[0054] PBS(PH=7.4):NaCl 8g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄ 1.78g、KH₂PO₄ 0.24g,溶于ddH₂O,加浓盐酸调至PH=7.4,定容至1L,高温高压灭菌。

[0055] 20mM磷酸盐(PH=7.5):Na₂HPO₄ 2.39g、NaH₂PO₄ 0.38g,溶于1L ddH₂O。

[0056] Binding Buffer(PH=7.5):取20mM磷酸盐1L,加入29.25g NaCl,NaCl终浓度

0.5M, 高温高压灭菌。

[0057] Wash Buffer (PH=7.5): 取400mL Binding Buffer加入1.02g咪唑, 咪唑终浓度30mM, 加入氢氧化钠调PH=7.5, 定容至500mL, 高温高压灭菌。

[0058] Elution Buffer (PH=7.5): 取200mL Binding Buffer加入5.1g咪唑, 咪唑终浓度250mM, 加入氢氧化钠调PH=7.5, 定容至300mL, 高温高压灭菌。

[0059] 实施例中所用的引物序列如表2所示。

[0060] 表2. 本发明实施例中所用引物序列

[0061]

引物名称	SEQ	ID	引物序列
------	-----	----	------

	NO.	
R G4SGG	1	TGCGTCCGTCTCTAGATCCACCTCCTCCAGATCCA
F N11S-4	2	ACGTCTCTATCTGTCTTCACACTCGAAGATTTTC
R N11S	3	ACGTCTCTGTTATGAGTTGATGGTTACTCGGAACA
F amp	4	TGCGTCCGTCTCCTTCGTTCCACTGAGCGTCAGA
R amp	5	GCTGACCGTCTCTCGAAAACCTCACGTTAAGGGAT
F 3flagGS	6	TCGTCTCTGACGATAAAGGAGGTGGTGGATCTGG AGGAGGTGGATCTGTCTTCACA
F 3flag oligo	7	ACAAGGATGACGACGATAAAGGACTATAAGGACGA TGATGACAAGGACTACAAAGATGAT
R 3flag oligo	8	CGTCATCATCTTTGTAGTCCTTGTCATCATCGTCCT TATAGTCCTTATCGTCGTCATCC
R 3flagGS	9	ACGTCTCTTTGTAATCTGAACCGCCACCGCCTGAT C CAGACGAGAGAATCTCCTC
[0062] F rop-bsa1	10	TGTGGTCTCTGAAGCGATTCACAGATGTCTG
R rop-bsa1	11	TGTGGTCTCTCTTCACGACCACGCTGATGAGCT
F pet28a-Chis2	12	TGTGGTCTCTTCGGGTCACCACCACCACCACCT GAGATCCG
R pet28a-Chis2	13	TGTGGTCTCTTCACCATGGTATATCTCCTTCTTAAA GTTAAA
R pet28a-Chis3	14	TGTGGTCTCTATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTA AA
F pet28a-flag2	15	TGTGGTCTCTCCATGGATTACAAGGATGACGACG ATAAGGTGACC
R pet28a-flag	16	TGTGGTCTCTCCGATGAGTTGATGGTTACTCGGAA
F SV40GG2	17	ACTCACCGTCTCTTAACTGGCCGCGACTCTAGATC AT
F pet28a-cov	18	TGTGGTCTCTGTGACCGGCTACCGGCTGTTCGA
R pet28a-cov	19	TGTGGTCTCTCCGAATCAACATCTGGTGATGTATG A

[0063] 实施例1一种用于Flag抗体检测的NanoSwitch分子开关

[0064] 一、原理

[0065] 本实施例以Flag抗体为例,展示本发明的基础设计。其设计思路和工作原理如下:

[0066] (1) 将SmBiT融合到LgBiT的N端;(2) 将能与抗体结合的多肽如3×flag插入LgBiT和SmBiT之间(图2A上);(3) 当无抗体存在时,SmBiT将能结合到LgBiT的相应位置,NanoSwitch处于全活性状态;(4) 当有特异性抗体存在,并结合到NanoSwitch中的特异性多肽上时,引起空间位阻和变构效应,导致SmBiT与LgBiT的结合障碍,此时NanoSwitch将处于部分失活状态,表现为加入底物后,光信号降低(图2A),因而这种信号变化就可以用来反映

特异性抗体分子的量。

[0067] Flag也称“Flag标签”,是常见的检测过表达蛋白的人工标签多肽,其序列为: DYKDDDDK (SEQ ID NO.20);其常见替换形式3×Flag是在其基础上再连接两个Flag标签,即 DYKDDDDK DYKDDDDK DYKDDDDK (SEQ ID NO.21)。

[0068] 二、方法

[0069] 1.SmBiT-LgBiT质粒构建

[0070] 质粒SmBiT-LgBiT的构建分两步进行,首先构建一个过渡质粒SmBiT-HBC,构建过程如下:以质粒RlucN-HBC(与中国专利申请CN 201610564291.6中的质粒RlucN-HBC相同)为模板,用引物F G4SGG7+R bsmb1vect扩增,PCR反应体系为:质粒RlucN-HBC 10ng,引物F G4SGG7 (10 μ M) 及R amp (10 μ M) 各0.4 μ l,2×PrimeSTAR Max Premix 10 μ l,灭菌超纯水补齐体积至20 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性3min;95 $^{\circ}$ C 15s,55 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 1min,35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段,将该回收片段命名为flag1。

[0071] 将寡核苷酸F C11 oligo和R C11 oligo退火并做5'磷酸化,反应体系如下:F C11 oligo 1 μ l (100 μ M)、R C11 oligo 1 μ l (100 μ M)、10X T4连接酶buffer 1 μ l、T4多核苷酸激酶 0.5 μ l、ddH₂O 6.5 μ l,总体积10 μ l。将反应管在PCR仪上进行反应,条件为37 $^{\circ}$ C 30min,95 $^{\circ}$ C 5min,然后进入降温循环,每循环降低1 $^{\circ}$ C,循环时间为15s,通过70个循环降低至25 $^{\circ}$ C,结束反应。取反应产物1 μ l,用ddH₂O 199 μ l稀释,然后取稀释后的产物(命名为frag2)与frag1做Golden gate连接反应,反应体系为:BsmB I酶0.75 μ l、Tango buffer 1 μ l、DTT 1 μ l、T7 DNA ligase 0.25 μ l、ATP 1 μ l、frag3 1 μ l (100ng)、frag4 1 μ l、ddH₂O补齐至10 μ l。反应条件:37 $^{\circ}$ C 4min,20 $^{\circ}$ C 4min,循环20次。80 $^{\circ}$ C 20min灭活反应。Golden gate产物转化JM109感受态细菌,涂板,克隆初筛,测序鉴定,正确的克隆命名为质粒SmBiT-HBC。

[0072] 接下来以质粒pNanoluc(由北京擎科生物技术有限公司合成和克隆,Nanoluc荧光素酶基因序列参见:Dixson等,NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells.ACS Chemical Biology, 2015)为模板,用引物F N11S-4+R N11S扩增,PCR反应体系为:质粒Nanoluc 10ng,引物F N11S-4 (10 μ M) 及RN11S (10 μ M) 各0.4 μ l,2X PrimeSTAR Max Premix 10 μ l,灭菌超纯水补齐体积至20 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性3min;95 $^{\circ}$ C 15s,55 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 20s,35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段,将该回收片段命名为frag3。以质粒SmBiT-HBC为模板,用引物F SV40GG2+R amp扩增,PCR反应体系为:质粒SmBiT-HBC 10ng,引物F SV40GG2 (10 μ M) 及R amp (10 μ M) 各0.4 μ l,2X PrimeSTAR Max Premix 10 μ l,灭菌超纯水补齐体积至20 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性3min;95 $^{\circ}$ C 15s,55 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 1min,35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段,将该回收片段命名为frag4。以质粒SmBiT-HBC为模板,用引物F amp+R G4SGG扩增,PCR反应体系为:质粒SmBiT-HBC 10ng,引物F amp (10 μ M) 及R G4SGG (10 μ M) 各0.4 μ l,2X PrimeSTAR Max Premix 10 μ l,灭菌超纯水补齐体积至20 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性3min;95 $^{\circ}$ C 15s,55 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 1min,35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段,将该回收片段命名为frag5。

[0073] 将以上得到的三个片段frag3、frag4、frag5做Golden gate连接反应,反应体系为:BsmB I酶0.75 μ l、Tango buffer 1 μ l、DTT 1 μ l、T7 DNA ligase 0.25 μ l、ATP 1 μ l、frag3 1 μ l (15ng)、frag4 2 μ l (60ng)、frag5 1 μ l (60ng) ddH₂O补齐至10 μ l。反应条件:37 $^{\circ}$ C 4min,

20°C 4min,循环20次。80°C 20min灭活反应。Golden gate产物转化JM109感受态细菌,涂板,克隆初筛,测序鉴定,正确的克隆命名为质粒SmBiT-LgBiT。

[0074] 2. 质粒NanoSwitch-3×flag构建

[0075] 以质粒SmBiT-LgBiT为模板,用引物F 3flag GS+R amp扩增。PCR反应体系为:质粒SmBiT-LgBiT 10ng,引物F 3flag GS(10μM)及R amp(10μM)各0.4μl,2X PrimeSTAR Max Premix 10μl,灭菌超纯水补齐体积至20μl。反应条件:95°C 预变性3min;95°C 15s,55°C 15s,72°C 30s,35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段,将该回收片段命名为frag6。

[0076] 以质粒SmBiT-LgBiT为模板,用引物R 3flag GS+F amp扩增。PCR反应体系为:质粒SmBiT-LgBiT 10ng,引物R 3flag GS(10μM)及F amp(10μM)各0.4μl,2X PrimeSTAR Max Premix 10μl,灭菌超纯水补齐体积至20μl。反应条件:95°C 预变性3min;95°C 15s,55°C 15s,72°C 30s,35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段,将该回收片段命名为frag7。

[0077] 将寡核苷酸F 3flag oligo和R 3flag oligo退火并做5'磷酸化,反应体系如下:F 3flag oligo 1μl(100μM)、R 3flag oligo 1μl(100μM)、10X T4连接酶buffer 1μl、T4多核苷酸激酶0.5μl、ddH₂O 6.5μl,总体积10μl。将反应管在PCR仪上进行反应,条件为37°C 30min,95°C 5min,然后进入降温循环,每循环降低1°C,循环时间为15s,通过70个循环降低至25°C,结束反应。取反应产物1μl,用ddH₂O 199μl稀释,将该片段命名为frag8。

[0078] 将以上得到的三个片段frag6、frag7、frag8做Golden gate连接反应,反应体系为:BsmBI酶0.75μl、Tango buffer 1μl、DTT 1μl、T7 DNA ligase 0.25μl、ATP 1μl、frag6 1μl(50ng)、frag7 1μl(50ng)、frag8 1μl ddH₂O补齐至10μl。反应条件:37°C 4min,20°C 4min,循环20次。80°C 20min灭活反应。Golden gate产物转化JM109感受态细菌,涂板,克隆初筛,测序鉴定,正确的克隆命名为质粒NanoSwitch-3×flag。

[0079] NanoSwitch-3×flag的分子开关基因序列(SEQ ID NO.22)如下:

[0080] ATGGTGACCGGCTACCGGCTGTTTCGAGGAGATTCTCtcgtctggatcagc
ggtggcggttcaGATTACAAGGATGACGACGATAAGGACTATAAGGACGATG
ATGACAAGGACTACAAAGATGATGACGATAAAaggagtggtggatctggaggaggt
ggatctGTCTTCACACTCGAAGATTTTCGTTGGGGACTGGGAACAGACA
GCCGCTACAACCTGGACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTGTCC
AGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTGTCCGTAACTCCGATCCAAAGG
ATTGTCCGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATCGACATCCATGTC
ATCATCCCGTATGAAGGTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCCAGATC
GAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCATCACTTT
AAGGTGATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACG
CCGAACATGCTGAACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCC
GTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACAGGGACCCTGTGGAAC
GGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCACCCCGACGGCTCC
ATGCTGTTCCGAGTAACCATCAACTCATAA

[0081] 注:序列起始3个和末端3个碱基分别为起始密码子和终止密码子,单下划线未加粗部分为SmBiT,小写部分为连接序列GS linker,双下划线为3×flag,单下划线加粗部分为LgBiT。GS linker是由氨基酸G和S组成的多肽,有很多种排列组合形式,可以常规替换NanoSwitch-3×flag的分子开关的连接序列。

[0082] 3. Flag抗体测试

[0083] 将质粒NanoSwitch-3×flag转染HEK293细胞,48小时后,通过液氮反复冻融裂解细胞,然后取9μl裂解液,加入1μl (1μg) flag抗体(对照组加入1μgGAPDH抗体),37℃孵育1小时后,使用市售Nanoluc检测试剂(Promega)检测Nanoluc活性。

[0084] 三、结果

[0085] 结果显示,与对照组相比,加入flag抗体使信号平均降低3.9倍(图2B)。

[0086] 本实施例结果表明,本发明的分子开关可以有效实现抗体的检测。

[0087] 实施例2NanoSwitch-3×flag的改进

[0088] 本实施例的目的是在实施例1的基础上,给出三种改进方案。

[0089] 改进方案1:将3个1×flag分别放置到SmBiT的N端,SmBiT与LgBiT之间,以及LgBiT的C端(NanoSwitch-1×flag-3);

[0090] 改进方案2,在改进方案1的基础上,只保留前两个1×flag;(NanoSwitch-1×flag-2NM),去除C端的1×flag。

[0091] 改进方案3,在改进方案1的基础上,去除N端的1×flag,保留后两个1×flag(NanoSwitch-1×flag-2MC)。

[0092] 一、方法

[0093] 1. 质粒NanoSwitch-1×flag-2MC的构建

[0094] 以质粒NanoSwitch-3×flag为模板,用引物F flag-SV40+R amp扩增。PCR反应体系为:质粒C11-3flag-N11S 10ng,引物F flag-SV40 (10μM) 及R amp (10μM) 各0.4μl,2X PrimeSTAR Max Premix 10μl,灭菌超纯水补齐体积至20μl。反应条件:95℃预变性3min;95℃ 15s,55℃ 15s,72℃ 30s,35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段,将该回收片段命名为frag9。

[0095] 以质粒NanoSwitch-3×flag为模板,用引物R flag-N11S+F C11-FLAG扩增。PCR反应体系为:质粒C11-3flag-N11S 10ng,引物R flag-N11S (10μM) 及F C11-FLAG (10μM) 各0.4 μl,2X PrimeSTAR Max Premix 10μl,灭菌超纯水补齐体积至20μl。反应条件:95℃预变性3min;95℃ 15s,55℃ 15s,72℃ 20s,35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段,将该回收片段命名为frag10。

[0096] 以质粒NanoSwitch-3×flag为模板,用引物F amp+R C11-FLAG扩增。PCR反应体系为:质粒C11-3flag-N11S 10ng,引物F amp (10μM) 及R C11-FLAG (10μM) 各0.4μl,2X PrimeSTAR Max Premix 10μl,灭菌超纯水补齐体积至20μl。反应条件:95℃预变性3min;95℃ 15s,55℃ 15s,72℃ 30s,35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段,将该回收片段命名为frag11。

[0097] 将以上得到的三个片段frag9、frag10、frag11做Golden gate连接反应,反应体系为:BsmB I酶0.75μl、Tango buffer 1μl、DTT 1μl、T7 DNA ligase 0.25μl、ATP 1μl、frag9 1μl (40ng)、frag10 1μl (10ng)、frag11 1μl (40ng) ddH2O补齐至10μl。反应条件:37℃ 4min,20℃ 4min,循环20次。80℃20min灭活反应。Golden gate产物转化JM109感受态细菌,涂板,克隆初筛,测序鉴定,正确的克隆命名为质粒NanoSwitch-1×flag-2MC。

[0098] NanoSwitch-1×flag-2MC的分子开关基因序列(SEQ ID NO.23)如下:

ATGGTGACCGGCTACCGGCTGTTTCGAGGAGATTCTCGACTACAAA
GATGATGACGATAAAggaggtggtggtatctggaggaggtgatctGTCTTCACACTCG
AAGATTTTCGTTGGGGACTGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTGG
ACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTGTCCAGTTTGCTGCAGAATC
 [0099] TCGCCGTGTCCGTAACTCCGATCCAAAGGATTGTCCGGAGCGGTG
AAAATGCCCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCGTATGAAG
GTCTGAGCGCCGACCAAATGGCCAGATCGAAGAGGTGTTTAAGG
TGGTGTACCCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTGATCCTGCCCT
ATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGCTGAACT
ATTTCCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAA
AGATCACTGTAACAGGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCG
 [0100] ACGAGCGCCTGATCACCCCGACGGCTCCATGCTGTTCCGAGTAA
CCATCAACTCAGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAA

[0101] 注：序列起始3个和末端3个碱基分别为起始密码子和终止密码子，单下划线未加粗部分为SmBiT，小写部分为连接序列(GS linker)，双下划线为1×flag，单下划线加粗部分为LgBiT。

[0102] 2.NanoSwitch-1×flag-3

[0103] 以质粒NanoSwitch-1×flag-2MC为模板，用引物F flag-C11+R amp扩增。PCR反应体系为：质粒C11-noGS-flag-10GS-N11S-noGS-flag 10ng，引物F flag-C11 (10μM) 及R amp (10μM) 各0.4μl，2X PrimeSTAR Max Premix 10μl，灭菌超纯水补齐体积至20μl。反应条件：95℃预变性3min；95℃ 15s，55℃ 15s，72℃ 30s，35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段，将该回收片段命名为frag12。

[0104] 以质粒NanoSwitch-1×flag-2MC为模板，用引物R flag-C11+Famp扩增。PCR反应体系为：质粒C11-noGS-flag-10GS-N11S-noGS-flag 10ng，引物R flag-C11 (10μM) 及F amp (10μM) 各0.4μl，2X PrimeSTAR Max Premix 10μl，灭菌超纯水补齐体积至20μl。反应条件：95℃预变性3min；95℃ 15s，55℃ 15s，72℃ 30s，35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段，将该回收片段命名为frag13。

[0105] 将以上得到的两个片段frag12、frag13做Golden gate连接反应，反应体系为：BsmB I酶0.75μl、Tango buffer 1μl、DTT 1μl、T7 DNA ligase 0.25μl、ATP 1μl、frag12 1μl (50ng)、frag13 1μl (40ng) ddH₂O补齐至10μl。反应条件：37℃ 4min，20℃ 4min，循环20次。80℃ 20min灭活反应。Golden gate产物转化JM109感受态细菌，涂板，克隆初筛，测序鉴定，正确的克隆命名为质粒NanoSwitch-1×flag-3。

[0106] NanoSwitch-1×flag-3的分子开关基因序列(SEQ ID NO.24)如下：

[0107] ATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGTGACCGGCTACCGGCT
GTTTCGAGGAGATTCTCGACTACAAAGATGATGACGATAAAaggaggtggtgga
tctggaggaggtggtatctGTCTTCACACTCGAAGATTTTCGTTGGGGACTGGGA
ACAGACAGCCGCCTACAACCTGGACCAAGTCCTTGAACAGGGAGG
TGTGTCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTGTCCGTAACTCCGAT
CCAAAGGATTGTCCGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATCGACAT
CCATGTCATCATCCCGTATGAAGGTCTGAGCGCCGACCAAATGGC
CCAGATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCA
TCACTTTAAGGTGATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATCGACGG
GGTTACGCCGAACATGCTGAACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGG
CATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACAGGGACCCT
GTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCACCCCGA
CGGCTCCATGCTGTTCCGAGTAACCATCAACTCAGATTACAAGGAT
GACGACGATAAGTAA

[0108] 注：序列起始3个和末端3个碱基分别为起始密码子和终止密码子，单下划线未加粗部分为SmBiT，小写部分为连接序列(GS linker)，双下划线为3×flag，单下划线加粗部分为LgBiT。

[0109] 3.NanoSwitch-1×flag-2NM

[0110] 以质粒NanoSwitch-1×flag-3为模板，用引物F SV40 GG2+R amp扩增。PCR反应体系为：质粒Flag-noGS-C11-noGS-flag-10GS-N11S-noGS-flag10ng，引物F SV40 GG2 (10μM) 及R amp (10μM) 各0.4μl，2X PrimeSTAR Max Premix 10μl，灭菌超纯水补齐体积至20μl。反应条件：95℃预变性3min；95℃ 15s，55℃ 15s，72℃ 30s，35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段，将该回收片段命名为frag14。

[0111] 以质粒NanoSwitch-1×flag-3为模板，用引物R N11S-del+Famp扩增。PCR反应体系为：质粒Flag-noGS-C11-noGS-flag-10GS-N11S-noGS-flag 10ng，引物R N11S-del (10μM) 及F amp (10μM) 各0.4μl，2X PrimeSTAR Max Premix 10μl，灭菌超纯水补齐体积至20μl。反应条件：95℃预变性3min；95℃ 15s，55℃ 15s，72℃ 30s，35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段，将该回收片段命名为frag15。

[0112] 将以上得到的两个片段frag14、frag15做Golden gate连接反应，反应体系为：BsmB I酶0.75μl、Tango buffer 1μl、DTT 1μl、T7 DNA ligase 0.25μl、ATP 1μl、frag14 1μl (50ng)、frag15 1μl (30ng) ddH2O补齐至10μl。反应条件：37℃ 4min，20℃ 4min，循环20次。80℃ 20min灭活反应。Golden gate产物转化JM109感受态细菌，涂板，克隆初筛，测序鉴定，正确的克隆命名为质粒NanoSwitch-1×flag-2NM。

[0113] NanoSwitch-1×flag-2NM的分子开关基因序列 (SEQ ID NO.25) 如下：

ATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGTGACCGGCTACCGGCT
 GTTCGAGGAGATTCTCGACTACAAAGATGATGACGATAAAggaggtggtgga
 tctggaggaggtgatctGTCTTCACACTCGAAGATTTTCGTTGGGGACTGGGA
 ACAGACAGCCGCCTACAACCTGGACCAAGTCCTTGAACAGGGAGG
 TGTGTCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTGTCCGTAACCTCCGAT
 CCAAGGATTGTCCGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATCGACAT
 [0114] CCATGTCATCATCCCGTATGAAGGTCTGAGCGCCGACCAAATGGC
 CCAGATCGAAGAGGTGTTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCA
 TCACTTTAAGGTGATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATCGACGG
 GGTTACGCCGAACATGCTGAACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGG
 CATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACAGGGACCCT
 GTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCACCCCGA
 CGGCTCCATGCTGTTCCGAGTAACCATCAACTCATAA

[0115] 注：序列起始3个和末端3个碱基分别为起始密码子和终止密码子，单下划线未加粗部分为SmBiT，小写部分为连接序列(GS linker)，双下划线为3×flag，单下划线加粗部分为LgBiT。

[0116] 4. flag抗体检测

[0117] 将构建好的表达质粒分别转染HEK293细胞，取其裂解液9μl，加入1μl (1μg) flag抗体(对照组加入1μg GAPDH抗体)，37℃孵育1小时后，检测NanoLuc活性。

[0118] 5. 亲和纯化验证

[0119] 为了进一步证明flag抗体的确能结合到带有flag多肽的NanoSwitch上，发明人用flag抗体或GAPDH抗体分别与表达NanoSwitch-1×flag-2NM的HEK293细胞裂解液孵育，然后用Protein A琼脂糖珠做亲和纯化，所得产物做Western blot鉴定。

[0120] 二、结果

[0121] 1. flag抗体检测

[0122] 与对照组相比，加入flag抗体使NanoSwitch-1×flag-3信号平均降低20.5倍，使NanoSwitch-1×flag-2NM信号平均降低33.1倍，使NanoSwitch-1×flag-2MC信号平均降低30.9倍(图2B)。

[0123] 2. 亲和纯化验证

[0124] flag抗体可以将NanoSwitch-1×flag-2NM沉淀出来，而GAPDH抗体则不能(图2C)。表明flag抗体的确能结合到自然状态下的NanoSwitch-1×flag-2NM分子上。

[0125] 本实施例的结果表明，三种改进方案相比实施例1的基础设计，显著提高了检测信噪比。

[0126] 实施例3NanoSwitch-1×flag-2检测flag抗体的特异性试验

[0127] 将NanoSwitch-1×flag-2NM做原核表达和纯化，进一步证明flag抗体的检测特异性。

[0128] 一、方法

[0129] 1. 质粒构建和原核表达纯化

[0130] 以质粒PET28a为模板，用引物F pet28a-Chis2+R rop-bsa1扩增。PCR反应体系为：质粒PET28a 10ng，引物F pet28a-Chis2 (10μM) 及R rop-bsa1 (10μM) 各0.4μl，2X PrimeSTAR Max Premix 10μl，灭菌超纯水补齐体积至20μl。反应条件：95℃预变性3min；95

℃ 15s, 55℃ 15s, 72℃ 45s, 35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段, 将该回收片段命名为frag16。

[0131] 以质粒PET28a为模板, 用引物R pet28a-Chis3+F rop-bsal扩增。PCR反应体系为: 质粒PET28a 10ng, 引物R pet28a-Chis3 (10 μ M) 及F rop-bsal (10 μ M) 各0.4 μ l, 2X PrimeSTAR Max Premix 10 μ l, 灭菌超纯水补齐体积至20 μ l。反应条件: 95℃ 预变性3min; 95℃ 15s, 55℃ 15s, 72℃ 45s, 35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段, 将该回收片段命名为frag17。

[0132] 以质粒NanoSwitch-1 \times flag-2为模板, 用引物F pet28a-flag2+R pet28a-flag扩增。PCR反应体系为: 质粒NanoSwitch-1 \times flag-2 10ng, 引物F pet28a-flag2 (10 μ M) 及R pet28a-flag (10 μ M) 各0.4 μ l, 2X PrimeSTAR Max Premix 10 μ l, 灭菌超纯水补齐体积至20 μ l。反应条件: 95℃ 预变性3min; 95℃ 15s, 55℃ 15s, 72℃ 20s, 35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段, 将该回收片段命名为frag18。

[0133] 将以上得到的三个片段frag16、frag17、frag18做Golden gate连接反应, 反应体系为: Bsal酶0.75 μ l、Tango buffer 1 μ l、DTT 1 μ l、T7 DNA ligase 0.25 μ l、ATP 1 μ l、frag16 1 μ l (60ng)、frag17 1 μ l (60ng)、frag18 1 μ l (15ng) ddH₂O补齐至10 μ l。反应条件: 37℃ 4min, 20℃ 4min, 循环20次。80℃ 20min灭活反应。Golden gate产物转化JM109感受态细菌, 涂板, 克隆初筛, 测序鉴定, 正确的克隆命名为质粒PET-NanoSwitch-1 \times flag-2。

[0134] 取测序正确的质粒PET-NanoSwitch-1 \times flag-2转化至Rosetta (DE3) 中, 涂布至含50ug/ml硫酸卡那霉素的LB平板上, 37℃培养16h。取单菌落至5ml含有50ug/ml硫酸卡那霉素的LB培养基中, 37℃, 220rpm, 16h。将5ml菌液接种到200ml含有50ug/ml硫酸卡那霉素的LB培养基中, 37℃, 220rpm, 培养至OD=0.6 (约3h)。加入IPTG至终浓度为1mM, 16℃, 180rpm, 16h。将菌液转移至离心管, 4℃, 4000rpm离心15min。弃上清, 加入PBS重悬, 4℃, 4000rpm, 15min。弃上清, 加入80ml Binding Buffer重悬, 超声破菌。取破菌液4℃, 12000rpm, 20min, 收集上清。用ddH₂O清洗镍柱两次, Binding Buffer清洗两次, 取步骤8中的上清过柱, 6s/滴。Wash Buffer清洗柱子3次, 加入20ml Elution Buffer洗脱目的蛋白。取3KD超滤管, 加入洗脱蛋白, 4℃, 4000rpm离心至剩余2ml液体。加入8ml PBS溶液, 4℃, 4000rpm离心至剩余2ml液体。重复3次。吸出超滤管中的蛋白, 测浓度, 保存于4℃。

[0135] 2. 与GAPDH抗体的特异性测试

[0136] 将flag抗体和GAPDH抗体分别做倍比稀释, 然后用原核表达纯化的NanoSwitch-1 \times flag-2NM检测。

[0137] 3.3 \times flag多肽竞争性干扰测试

[0138] 合成了3 \times flag多肽, 将其以不同浓度加入NanoSwitch-1 \times flag-2NM+flag抗体反应体系中, 然后检测其Nanoluc活性变化情况。以100 μ g/ml无关多肽p21或者pG4为对照, 加入到NanoSwitch-1 \times flag-2NM+flag抗体反应体系中。

[0139] 二、结果

[0140] 1. 与GAPDH抗体的特异性测试

[0141] 结果显示 (图3A), 随着flag抗体的量逐渐增加, Nanoluc活性逐渐降低, 而GAPDH抗体量的增加, 并不显著改变Nanoluc活性。

[0142] 该结果表明: NanoSwitch-1 \times flag-2NM的信号变化具有很好的特异性, 且当flag

抗体浓度为1.6-51.2 μ g/ml时,信号与抗体浓度之间具有很好的剂量依赖关系。

[0143] 2. 3 \times flag多肽竞争性干扰测试

[0144] 加入3 \times flag多肽(flag pep)的浓度越高,由于其竞争性地与flag抗体结合,反应体系的Nanoluc活性也逐渐恢复。而无关多肽p21或者pG4无法改变Nanoluc活性。

[0145] 该结果表明:flag抗体与NanoSwitch-1 \times flag-2NM的结合具有特异性,且这种结合导致了NanoSwitch-1 \times flag-2NM的Nanoluc酶活性降低,因而其信号变化可以反映flag抗体的量。

[0146] 总之,NanoSwitch-1 \times flag-2NM可对flag抗体进行特异性检测。

[0147] 实施例4用于新冠病毒(SARS-CoV-2)检测的NanoSwitch分子开关

[0148] 采用了两种多肽,pG4和p21,以三种不同的方式放置到NanoSwitch中。第一种是仅有C端1个拷贝(标记为pG4-C和p21-C),第二种是仅有LgBiT和SmBiT之间1个拷贝(标记为pG4-M和p21-M),第三种是LgBiT和SmBiT之间1个拷贝,N端有1个拷贝(标记为pG4-MC和p21-MC),第四种是前述两种的综合,含有两个拷贝多肽(标记为pG4-NM和p21-NM),第五种是在第三种的基础上,在N端增加1个拷贝(标记为pG4-NMC和p21-NMC)。

[0149] pG4的多肽序列(SEQ ID NO.26)如下:

[0150] LQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVD

[0151] p21的多肽序列(SEQ ID NO.27)如下:

[0152] PSKPSKRSFIEDLLFNKV

[0153] 一、方法

[0154] 采用实施例1、2的方法,合成表达前述NanoSwitch的质粒。相比实施例1和2所得质粒,本实施例合成的质粒仅涉及将Flag或3 \times Flag基因序列替换成pG4或p21的基因序列,其中pG4的基因序列(SEQ ID NO.28)为:

[0155] TTGCAACCTGAATTAGACTCATTCAAGGAGGAGTTAGATAAATATTTTAAGAATCATACATCACCAGATGTTGAT

[0156] p21的基因序列(SEQ ID NO.29)为:

[0157] CCATCAAAACCAAGCAAGAGGTCATTTATTGAAGATCTACTTTTCAACAAAGTG

[0158] 质粒分别转染HEK293细胞,然后取9 μ l裂解液的稀释液,分别加入1 μ l新冠感染者血清(4位患者),同时以乙肝病毒感染者血清,或者健康人血清作为对照。室温孵育20分钟后,直接检测体系中的Nanoluc活性。

[0159] 二、结果

[0160] 结果如图4所示。

[0161] 两种多肽采用第一种和第二种构造,即单一拷贝不能反映血清中新冠病毒抗体情况。

[0162] 而第三、四、五种构造能反映抗体情况,其中第四种构造检测信噪比相对更高,将检测pG4和p21抗体的分子开关,分别命名为NanoSwitch-pG4和NanoSwitch-p21。两种多肽相比,pG4的检测效果比p21更好。例如,对于1号样本,pG4-MC的信号增加超过健康对照血清223倍。

[0163] 值得注意的是,与实施例1、2检测flag抗体的NanoSwitch的情况有所不同,NanoSwitch-pG4和NanoSwitch-p21在加入新冠患者血清后,都表现为Nanoluc活性增加,而

非降低。

[0164] 上述结果说明,在pG4抗体或p21抗体检测时,LgBiT和SmBiT之间除了需要有抗原多肽以外,在C端一侧和/或N端一侧还需要有一段抗原多肽。且检测到目标抗体后荧光酶活性增加而非降低。

[0165] 实施例5 NanoSwitch-pG4和NanoSwitch-p21的竞争抑制试验

[0166] 为了证明NanoSwitch-pG4和NanoSwitch-p21检测新冠病毒抗体的特异性,进行了竞争抑制试验。发明人合成了pG4和p21两种多肽,将这两种多肽以不同浓度加入到实施例4的第4种构造的NanoSwitch+新冠血清体系当中,然后检测Nanoluc活性。

[0167] 结果显示,随着特异性多肽浓度的增加,两种分子开关的Nanoluc活性都逐渐降低(图5)。

[0168] 这表明血清中的新冠抗体能特异性地结合到上述两种NanoSwitch分子。

[0169] 实施例6 NanoSwitch-pG4检测新冠病毒抗体的动态范围

[0170] 1. 方法

[0171] 原核表达实施例4中拥有所述第四种构造(即中部和C端带pG4多肽)的NanoSwitch-pG4,将具有较高滴度的新冠病毒肺炎患者血清进行梯度稀释,检测线性范围。

[0172] 其中,原核表达的方法如下:

[0173] ①质粒PET-NanoSwitch-pG4构建

[0174] 以质粒PET28a为模板,用引物F pet28a-Chis2+R rop-bsa1扩增。PCR反应体系为:质粒PET28a 10ng,引物F pet28a-Chis2 (10 μ M)及R rop-bsa1 (10 μ M)各0.4 μ l,2X PrimeSTAR Max Premix 10 μ l,灭菌超纯水补齐体积至20 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性3min;95 $^{\circ}$ C 15s,55 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 45s,35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段,将该回收片段命名为frag19。

[0175] 以质粒PET28a为模板,用引物R pet28a-Chis2+F rop-bsa1扩增。PCR反应体系为:质粒PET28a 10ng,引物R pet28a-Chis2 (10 μ M)及F rop-bsa1 (10 μ M)各0.4 μ l,2X PrimeSTAR Max Premix 10 μ l,灭菌超纯水补齐体积至20 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性3min;95 $^{\circ}$ C 15s,55 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 45s,35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段,将该回收片段命名为frag20。

[0176] 以质粒SmBiT-LgBiT-2xpG4-MC为模板,用引物F pet28a-cov+R pet28a-cov扩增。PCR反应体系为:质粒SmBiT-LgBiT-2xpG4-MC 10ng,引物F pet28a-cov (10 μ M)及R pet28a-cov (10 μ M)各0.4 μ l,2X PrimeSTAR Max Premix 10 μ l,灭菌超纯水补齐体积至20 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性3min;95 $^{\circ}$ C 15s,55 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 20s,35个循环。用胶回收试剂盒回收扩增片段,将该回收片段命名为frag21。

[0177] 将以上得到的三个片段frag19、frag20、frag21做Golden gate连接反应,反应体系为:BsaI酶0.75 μ l、Tango buffer 1 μ l、DTT 1 μ l、T7 DNA ligase 0.25 μ l、ATP 1 μ l、frag19 1 μ l (60ng)、frag20 1 μ l (60ng)、frag21 1 μ l (15ng) ddH₂O补齐至10 μ l。反应条件:37 $^{\circ}$ C 4min,20 $^{\circ}$ C 4min,循环20次。80 $^{\circ}$ C 20min灭活反应。Golden gate产物转化JM109感受态细菌,涂板,克隆初筛,测序鉴定,正确的克隆命名为质粒pET-NanoSwitch-pG4。

[0178] ②NanoSwitch-pG4的原核表达与纯化

[0179] 取测序正确的质粒pET-NanoSwitch-pG4转化至Rosetta (DE3)中,涂布至含50ug/

ml硫酸卡那霉素的LB平板上,37℃培养16h。取单菌落至5ml含有50ug/ml硫酸卡那霉素的LB培养基中,37℃,220rpm,16h。将5ml菌液接种到200ml含有50ug/ml硫酸卡那霉素的LB培养基中,37℃,220rpm,培养至OD=0.6(约3h)。加入IPTG至终浓度为1mM,16℃,180rpm,16h。将菌液转移至离心管,4℃,4000rpm离心15min。弃上清,加入PBS重悬,4℃,4000rpm,15min。弃上清,加入80ml Binding Buffer重悬,超声破菌。取破菌液4℃,12000rpm,20min,收集上清。用ddH₂O清洗镍柱两次,Binding Buffer清洗两次,取步骤8中的上清过柱,6s/滴。Wash Buffer清洗柱子3次,加入20ml Elution Buffer洗脱目的蛋白。取3KD超滤管,加入洗脱蛋白,4℃,4000rpm离心至剩余2ml液体。加入8ml PBS溶液,4℃,4000rpm离心至剩余2ml液体。重复3次。吸出超滤管中的蛋白,测浓度,保存于4℃。

[0180] 2. 结果

[0181] 该样品稀释到512倍之前,Nanoluc活性都随着稀释度升高而下降,表现出较宽的线性范围(图6)。

[0182] 实施例7 NanoSwitch-pG4用于新冠病毒感染者血清抗体检测

[0183] 1. 方法

[0184] 用实施例6原核表达得到的NanoSwitch-pG4检测了198例非新冠感染者血清,以及111份新冠抗体阳性血清。这些新冠感染者血清样本来源于之前的一项研究,利用一种已经批准用于新冠抗体临床检测的试剂盒(Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. Nature Medicine, 2020),对这些样本进行测试,确认其为新冠抗体阳性。

[0185] 检测过程如下:取原核表达纯化的NanoSwitch-pG4 0.05ng(溶于成分如下的9μl缓冲液中(50mM Hepes (PH7.5),3mM EDTA,150mM NaCl,0.005%(v/v) Tween-20,10mM DTT),然后取血清1μl,加入体系中,37℃孵育10min,然后用Nanoluc检测试剂(Promega)直接检测。

[0186] 检测结果显示,用NanoSwitch-pG4能很好地区分新冠抗体阳性和阴性者,ROC中AUC=0.9909(P<0.0001)(图7A)。当取Cutoff值为1265时,灵敏度和特异性分别达到97.3%和97.0%(图7B)。

[0187] 发明人根据这一cutoff值,计算出每一检测样品的新冠抗体滴度值,并根据来源于同一患者的血清样本检测值绘制抗体滴度变化曲线。结果发现,依据本方法所测得的抗体滴度变化趋势,与基于磁微粒化学发光法(MCLIA,已获批用于临床检测)测得的抗体滴度变化趋势之间,有很好的一致性,完全能反映感染早期抗体由阴转阳的过程,以及其后抗体上升或下降的过程(图8显示了6个患者的具体情况)。与磁微粒化学发光法相比,本法检测步骤大幅度减少,完全无需各种洗涤和更换缓冲液的步骤,而仅需加样、孵育、检测三步即可完成,检测时间45min以内。同时样品仅需1μl,且无需稀释,非常简便。

[0188] 本实施例的结果说明,本发明的NanoSwitch-pG4可用于新冠病毒抗体的检测,其过程简单,准确性高。

[0189] 综上,本发明用于抗体检测的分子开关,可有效检测各种抗体,检测线性范围大,特异性和准确性高。

SEQUENCE LISTING

<110> 重庆医科大学

<120> 用于抗体检测的多功能蛋白分子开关

<130> GY363-2020P0112063CCR4

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

tgcgtccgtc tctagatcca cctcctccag atcca 35

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

acgtctctat ctgtcttcac actcgaagat ttc 33

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

acgtctctgt tatgagttga tggttactcg gaaca 35

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

tgcgtccgtc tccttcgttc cactgagcgt caga 34

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

gctgaccgtc tctcgaaaac tcacgttaag ggat 34

<210> 6

<211> 56

<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 6
tcgtctctga cgataaagga ggtggtggat ctggaggagg tggatctgtc ttcaca 56
<210> 7
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 7
acaaggatga cgacgataag gactataagg acgatgatga caaggactac aaagatgat 59
<210> 8
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 8
cgtcatcatc tttgtagtcc ttgtcatcat cgtccttata gtccttatcg tcgtcatcc 59
<210> 9
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 9
acgtctcttt gtaatctgaa ccgccaccgc ctgatccaga cgagagaatc tcctc 55
<210> 10
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 10
tgtggtctct gaagcgattc acagatgtct g 31
<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 11
tgtggtctct cttcacgacc acgetgatga gct 33
<210> 12
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 12

tgtggtctct tcgggtcacc accaccacca ccaactgagat ccg 43
<210> 13
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 13

tgtggtctct tcacccatggt atatctcctt cttaaagtta aa 42
<210> 14
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 14

tgtggtctct atggtatata tccttcttaa agttaaa 37
<210> 15
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 15

tgtggtctct ccatggatta caaggatgac gacgataagg tgacc 45
<210> 16
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 16

tgtggtctct ccgatgagtt gatggttact cggaa 35
<210> 17
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 17

actcaccgtc tcttaactgg ccgactct agatcat 37
<210> 18
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 18

tgtggtctct gtgaccggt accggtggt cga 33
<210> 19
<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 19

tgtggtctct ccgaatcaac atctggtgat gatatga 36

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 20

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 21

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 21

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

20

<210> 22

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 22

atggtgaccg gctaccggct gttcaggag attctctcgt ctggatcagg cggtagcggt 60
 tcagattaca aggatgacga cgataaggac tataaggacg atgatgacaa ggactacaaa 120
 gatgatgacg ataaaggagg tggtagatct ggaggagtg gatctgtctt cacactcgaa 180
 gatttcgttg gggactggga acagacagcc gctacaacc tggaccaagt ccttgaacag 240
 ggagggtgtg ccagtttctc gcagaatctc gccgtgtccg taactccgat ccaaaggatt 300
 gtccggagcg gtgaaaatgc cctgaagatc gacatccatg tcatcatccc gtatgaaggt 360
 ctgagcgccg accaaaatggc ccagatcgaa gaggtgttta aggtggtgta ccctgtggat 420
 gatcatcaact ttaaggatgat cctgccctat ggcacactgg taatcgacgg ggttacgccg 480
 aacatgctga actatttcgg acggccgtat gaaggcatcg ccgtgttcga cggcaaaaag 540
 atcaactgtaa caggaccct gtggaacggc aacaaaatta tcgacgagcg cctgatcacc 600
 cccgacggct ccagctgttt ccgagtaacc atcaactcat aa 642

<210> 23

<211> 591

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 23

atggtgaccg gctaccggct gttcgaggag attctcgact acaaagatga tgacgataaa 60
 ggagggtggtg gatctggagg aggtggatct gtcttcacac tcgaagattt cgttggggac 120
 tgggaacaga cagccgccta caacctggac caagtccttg aacaggagg tgtgtccagt 180
 ttgctgcaga atctcgccgt gtccgtaact ccgatccaaa ggattgtccg gagcgggtgaa 240
 aatgccctga agatcgacat ccatgtcatc atcccgtatg aaggtctgag cgccgaccaa 300
 atggcccaga tcgaagaggt gttaaggtg gtgtaccctg tggatgatca tcactttaag 360
 gtgatcctgc cctatggcac actggtaatc gacggggta cggcgaacat gctgaactat 420
 ttcggacggc cgtatgaagg catcgccgtg ttcgacggca aaaagatcac tgtaacaggg 480
 accctgtgga acggcaacaa aattatcgac gacgcctga tcccccca cggctccatg 540
 ctgttccgag taaccatcaa ctacagattac aaggatgacg acgataagta a 591

<210> 24

<211> 615

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 24

atggattaca aggatgacga cgataaggtg accggctacc ggctgttcga ggagattctc 60
 gactacaaag atgatgacga taaaggaggt ggtggatctg gaggaggtgg atctgtcttc 120
 aactcgaag atttcgttgg ggactgggaa cagacagccg cctacaacct ggaccaagtc 180
 cttgaacagg gaggtgtgtc cagtttctgt cagaatctcg ccgtgtccgt aactccgatc 240
 caaaggattg tccggagcgg tgaaaatgcc ctgaagatcg acatccatgt catcatccc 300
 tatgaaggtc tgagcgccga ccaaattgcc cagatcgaag aggtgtttaa ggtggtgtac 360
 cctgtggatg atcatcactt taaggatgat ctgccctatg gcacactggt aatcgacggg 420
 gttacgccga acatgctgaa ctatttcgga cggccgatg aaggcatcgc cgtgttcgac 480
 ggcaaaaaga tcaactgtaac agggaccctg tggaacggca acaaaattat cgacgagcgc 540
 ctgatcacc cgcacggctc catgctgttc cgagtaacca tcaactcaga ttacaaggat 600
 gacgacgata agtaa 615

<210> 25

<211> 591

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 25

atggattaca aggatgacga cgataaggtg accggctacc ggctgttcga ggagattctc 60
 gactacaaag atgatgacga taaaggaggt ggtggatctg gaggaggtgg atctgtcttc 120
 aactcgaag atttcgttgg ggactgggaa cagacagccg cctacaacct ggaccaagtc 180
 cttgaacagg gaggtgtgtc cagtttctgt cagaatctcg ccgtgtccgt aactccgatc 240
 caaaggattg tccggagcgg tgaaaatgcc ctgaagatcg acatccatgt catcatccc 300
 tatgaaggtc tgagcgccga ccaaattgcc cagatcgaag aggtgtttaa ggtggtgtac 360

cctgtggatg atcatcactt taagtgatc ctgccctatg gcacactggt aatcgacggg 420
 gttacgccga acatgctgaa ctatttcgga cggccgatg aaggcatcgc cgtgttcgac 480
 ggcaaaaaga tcaactgtaac agggaccctg tggaacggca acaaaattat cgacgagcgc 540
 ctgatcacc cgcacggctc catgctgttc cgagtaacca tcaactcata a 591

<210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 26

Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe

1 5 10 15

Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp

20 25

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 27

Pro Ser Lys Pro Ser Lys Arg Ser Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn

1 5 10 15

Lys Val

<210> 28

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 28

ttgcaacctg aattagactc attcaaggag gagttagata aatattttaa gaatcataca 60

tcaccagatg ttgat 75

<210> 29

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 29

ccatcaaaaac caagcaagag gtcatttatt gaagatctac ttttcaacaa agtg 54

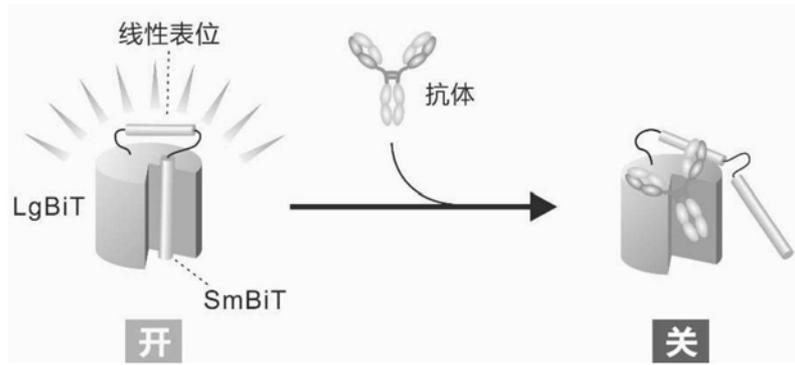


图1

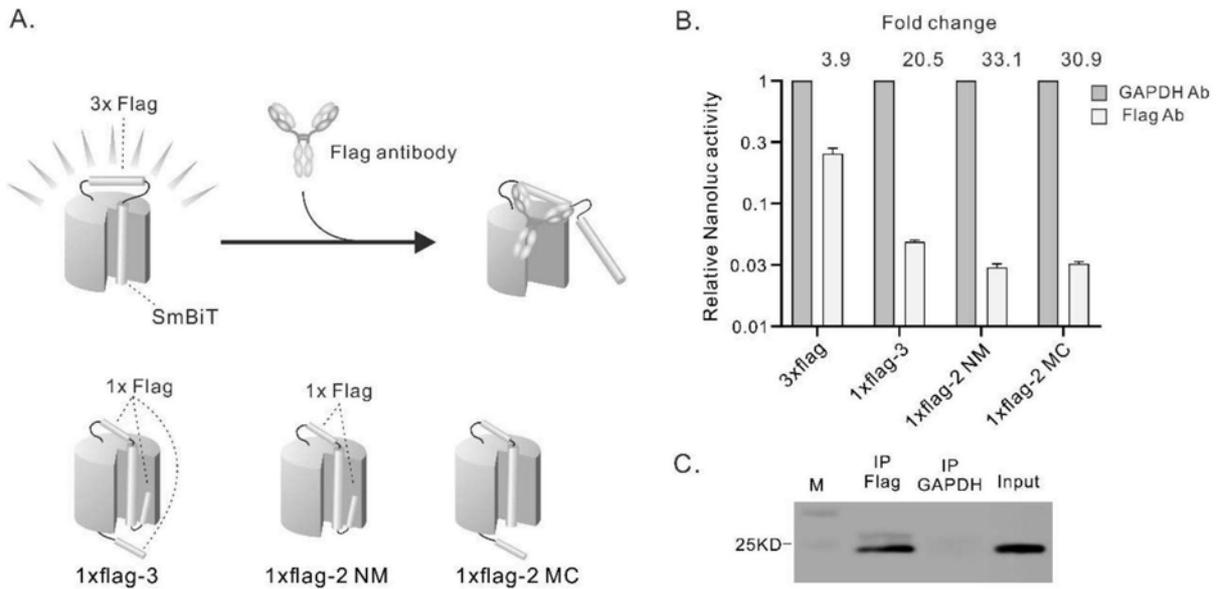


图2

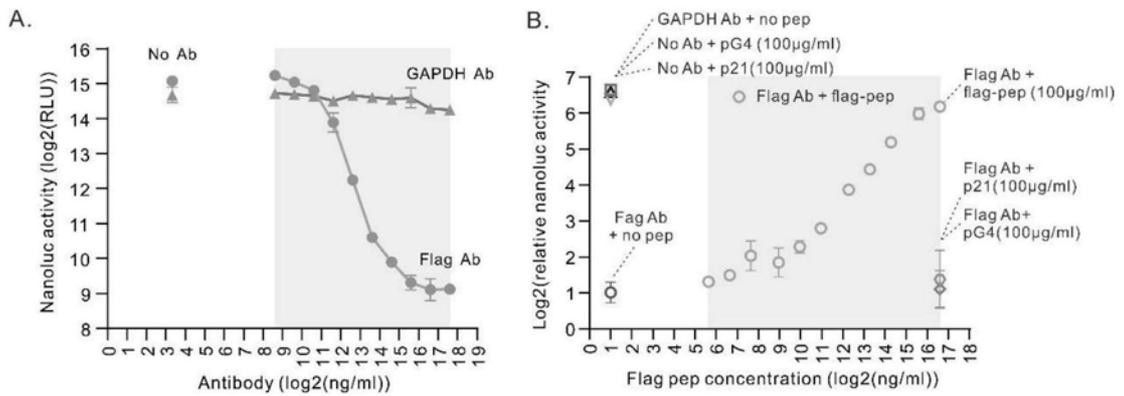


图3

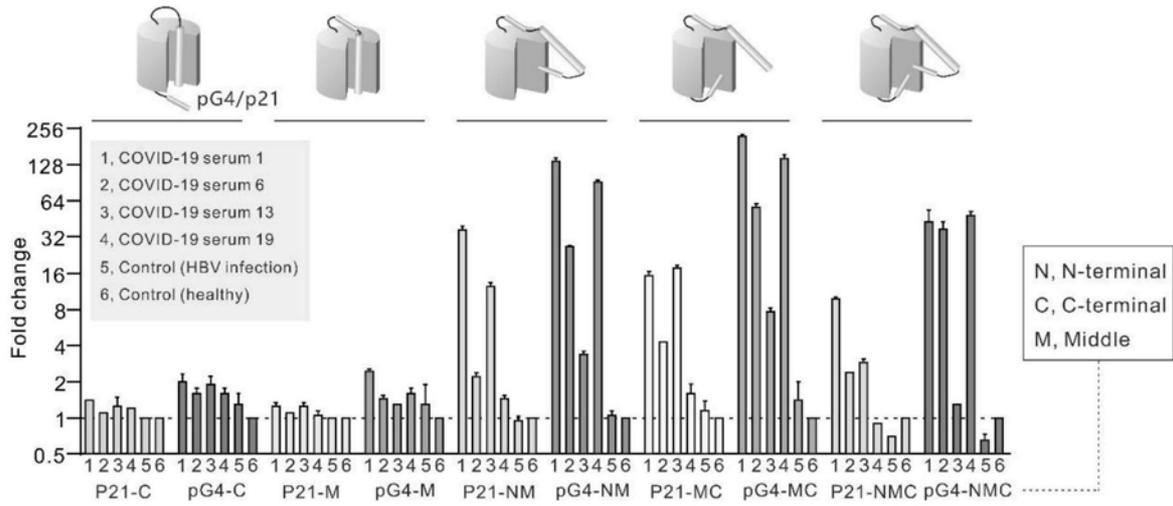


图4

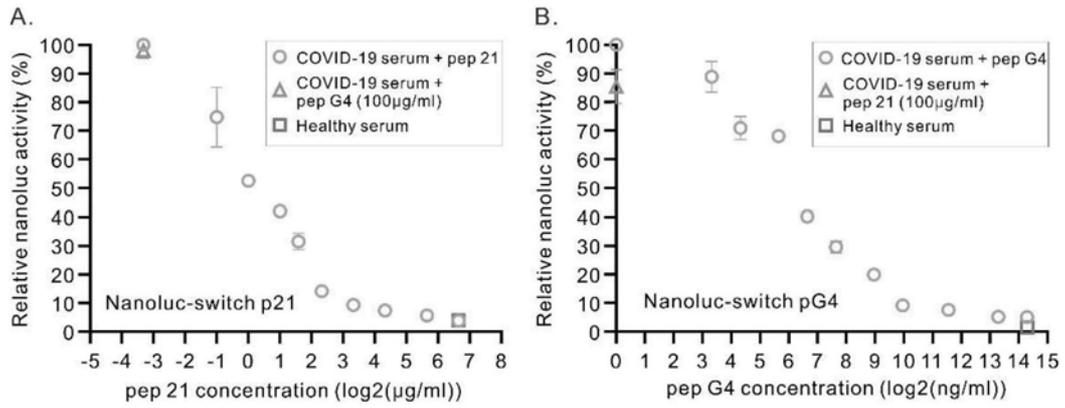


图5

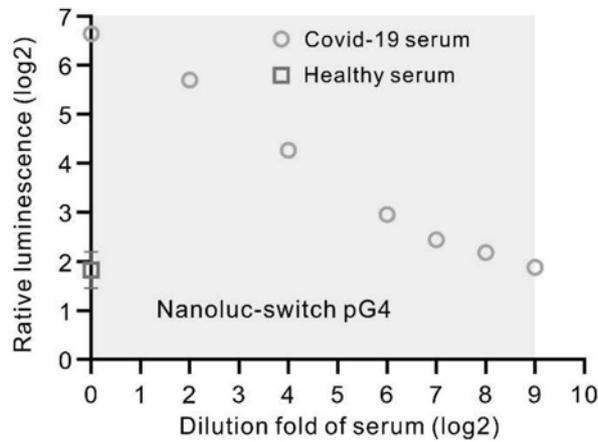


图6

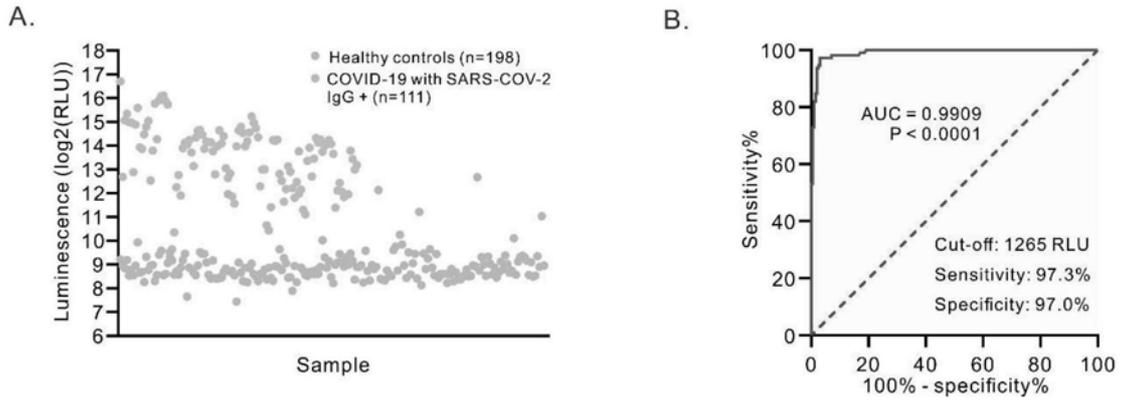


图7

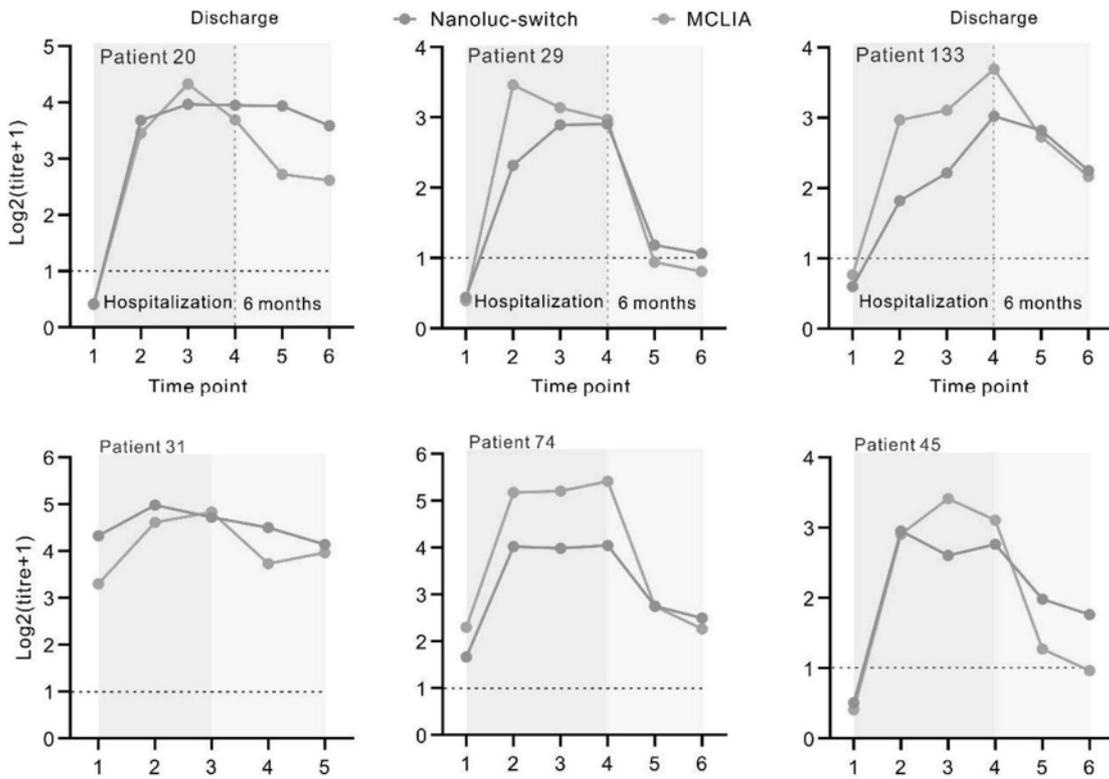


图8