



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106146627 B

(45)授权公告日 2019.11.12

(21)申请号 201510149331.6

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2015.03.31

B01J 20/24(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

B01J 20/30(2006.01)

申请公布号 CN 106146627 A

C07K 16/00(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

(43)申请公布日 2016.11.23

(56)对比文件

(73)专利权人 上海业力生物科技有限公司

CN 104220458 A,2014.12.17,

地址 200231 上海市闵行区银都路218号聚

WO 2014193176 A1,2014.12.04,

科生物园2A楼406-408

CA 2817579 A1,2012.04.14,

(72)发明人 景钰湘 叶绿 孙兆贵

AU 2007346592 A1,2009.08.27,

(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

US 2004009528 A1,2004.01.15,

代理人 胡美强 沈利

赵荣茂.人IgG Fc标签融合表达载体的构建及H5 HA1融合蛋白的表达.《中国生物制品学杂志》.2011,第 24 卷(第 10 期),1130-1133.

(51)Int.Cl.

审查员 吕健

C07K 14/315(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/31(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

序列表4页 附图3页

(54)发明名称

Fc特异结合蛋白、IgG亲和层析介质及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种Fc特异结合蛋白、IgG亲和层析介质及其制备方法与应用。所述Fc特异结合蛋白包括3~6个重复的C2段,每个所述C2段直接含有1~12个亲水性氨基酸组成的多肽,所述C2段的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.4所示;所述的亲水氨基酸为选自甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸和谷氨酸中的一种或多种。所述的Fc特异结合蛋白能够特异性地结合IgG,所述的IgG亲和层析介质能够特异性结合IgG,并应用于偶联于不同的固相介质,从不同的组织液中分离、纯化IgG抗体,广泛地应用于制备有关试剂或有关抗体或抗原的检测。

1. 一种Fc特异结合蛋白,其特征在于,所述的Fc特异结合蛋白的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2所示。
2. 一种Fc特异结合蛋白的基因,其特征在于,其核苷酸序列为编码如权利要求1所述的Fc特异结合蛋白的核苷酸序列。
3. 如权利要求2所述的Fc特异结合蛋白的基因,其特征在于,其核苷酸序列为序列表中SEQ ID No.3所示的核苷酸序列。
4. 一种含有如权利要求2或3所述的基因的重组表达质粒。
5. 一种含有如权利要求4所述的重组表达质粒的转化子。
6. 一种制备如权利要求1所述的Fc特异结合蛋白的方法,其包括以下的步骤:培养如权利要求5所述的转化子,从培养物获得所述的Fc特异结合蛋白。
7. 一种如权利要求1所述的Fc特异结合蛋白在非诊断目的的IgG抗体或抗原的酶联免疫检测中的应用。
8. 一种IgG亲和层析介质,其包括固相介质和偶联在所述固相介质上的如权利要求1所述的Fc特异结合蛋白。
9. 如权利要求8所述的IgG亲和层析介质,其特征在于,所述的固相介质为琼脂糖介质、酶标板或硝酸纤维素膜。
10. 如权利要求9所述的IgG亲和层析介质,其特征在于,所述的琼脂糖介质为选自Aogarose 6B、Aogarose CL-4B、Aogarose CL-6B、Aogarose CL-2B、Aogarose 4FF或Aogarose 6FF中的一种或多种。
11. 一种制备如权利要求9或10所述的IgG亲和层析介质的方法,其特征在于,其包括以下的步骤:
  - (1)、清洗活化的固相介质,得到活化的固相介质;
  - (2)、将如权利要求1所述的Fc特异结合蛋白与步骤(1)所得的活化的固相介质通过所述的活化的固相介质的羟基共价偶联,即可。
12. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,其还包括以下的步骤:
  - (3)、封闭步骤(2)所得的IgG亲和层析介质中的活性基团,洗净,即可。
13. 一种如权利要求8所述的IgG亲和层析介质在IgG抗体分离和纯化中的应用。
14. 一种如权利要求8所述的IgG亲和层析介质在单克隆抗体分离和纯化中的应用。

## Fc特异结合蛋白、IgG亲和层析介质及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学领域,具体涉及一种Fc特异结合蛋白、IgG亲和层析介质及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 存在于体液内和淋巴细胞表面,具有特殊的化学结构和免疫功能的球蛋白,是抗体和抗原之间免疫反应的物质基础。按结构和功能的不同,抗体可分为五大类: IgG, IgM, IgA, IgD和IgE。抗体分子不同类别是由各自重链的结构决定的,重链分为 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 及 $\epsilon$ 链五类,又可按重链抗原性的不同分为不同的亚类。五类Ig分子的轻链都相同,可分为 $\kappa$ 型和 $\lambda$ 型,两型间的氨基酸和抗原性不尽相同。轻链和重链氨基末端的氨基酸顺序易发生变化,故这部分称为可变区(V区)。V区是用以识别抗原和决定抗体特异性的部位。肽链其余部分(即羧基末端)氨基酸的数目和顺序相对恒定,故称稳定区(C区),标记为Fc段。人类的IgG可按重链氨基酸的不同分为IgG1~IgG4四个亚类。

[0003] 最早发现来源于金黄色葡萄球菌的蛋白A(Protein A)可以特异结合人和实验动物的IgG。蛋白A有6个不同的免疫球蛋白(IgG)结合位点。1个A蛋白分子至少可以结合2个IgG。A蛋白对IgG有高亲和力和特异性,其与IgG的结合强度与该抗体的物种来源有关,而其动态结合能力与结合强度及其他因素,如上样时的流速有关。对于其和不同的IgG亚型的结合常数存在差异,已经得到广泛的研究。目前主要关注来自链球菌属(*Streptococcus sp.*)的蛋白A,称为SPA。SPA结合谱较窄,不能结合占人IgG总量8%的IgG3,与某些哺乳动物的IgG没有或仅具有很低的结合能力。

[0004] 后来,发现蛋白G(Protein G)是一种源自链球菌G族的细胞表面蛋白,类似的,称为SPG,包括与IgG抗体Fc特异结合的区域,由三个55个氨基酸残基的同源结构组成,分别标记为C1、C2和C3三个重复序列。G蛋白可以与IgG的Fc区域特异性结合,并且广泛、更强地结合许多类型的IgG,如人IgG全部四个亚类,即人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。然而,虽然SPA和SPG识别Fc的决定性区域相同的或重叠的,但SPG识别一个不被SPA识别的特异性Fab区域。

[0005] 目前抗体分离纯化方法很多,主要有盐析法,辛酸-硫酸铵沉淀法,过滤层析,以及亲和层析法等。其中亲和层析通过偶联不同亲和物,包括蛋白类物质,对目的蛋白等选择性的吸附,已达到纯化和分离目的蛋白的目的。无论是多克隆抗体,还是单克隆抗体,以及嵌合抗体,都可以通过亲和层析法来分离纯化。最近,借助SPA或者SPG以及类似物偶联于固体介质,多为琼脂糖(agarose)或类似物(Sepharose、Aogarose),来进行IgG的分离纯化,不仅用于抗体药物的制备,而且可用于血液有害IgG抗体的特异性去除。由于抗体药物的应用越来越广泛,特别是随着基因工程抗体药物的大量开发,IgG纯化介质的开发越来越重要。同时,组织器官移植和免疫疾病中IgG抗体的异常产生,会对机体产生伤害,也有必要制备合适的IgG特异去除介质,以清除血液有害的IgG抗体。

[0006] 参照已有文献,已经有许多学者尝试利用基因工程手段将链球菌G148编码SPG的基因克隆至大肠杆菌,表达的SPG分子量有47、57和65KDa三种,但一般认为后者是完整的

SPG分子,而前两者是SPG分子在大肠杆菌体内翻译后发生降解,切除了N-末端信号肽(1~33位氨基酸残基)所致。虽然上述几种SPG在分子量方面差别很大,但都具有相似的IgG-Fc段结合能力。但是,上述的重组表达片段较小(12.25kD),仅仅含有针对IgG-Fc的一个结合位点;而且一般位于细菌沉淀中,主要以包涵体的形式存在,难以分离纯化可溶性的蛋白;同时,尚存在与琼脂糖固体介质偶联的缺陷。此外,通过带有GST和6×His双标签的融合蛋白表达,获得C端带有3个Cys接头的高载量重组蛋白G的融合蛋白,虽然其对诱导表达时的菌体密度、IPTG浓度、诱导时间和接种量四个表达条件进行了优化,但是融合蛋白很大程度上一部分存在于包涵体,同时GST部分的掺入,可能影响目的蛋白的功能,并增加了非特异性结合。

[0007] 目前应用的抗体亲和分离介质存在许多缺陷:(1) IgG抗体的结合特异性存在不足。这种主要是由于直接链球菌蛋白在蛋白A和G基础上,通过直接从有关菌株分离,或者重组表达的蛋白,除了特异与IgG抗体的Fc结合以外,还结合Fab区段。例如文献报道,直接从链球菌G148菌株悬液分离的SPG与Fab段存在较低亲和力的结合。(2) 由于SPA和SPG蛋白的疏水性导致其水溶性较差,同时在细菌中重组表达时大量产物聚集形成包涵体,为纯化分离具有高的亲和活性的蛋白产物带来障碍。(3) 结合IgG的蛋白与固体介质偶联不够简易,结合程度不够牢固,而且在与介质偶联会造成蛋白活性的损伤。

### 发明内容

[0008] 本发明针对IgG抗体的结合特异性存在不足、纯化分离具有高的亲和活性的蛋白产物存在障碍、所结合的IgG的蛋白与固体介质偶联较为繁琐不牢固,会造成蛋白活性的损伤的缺陷,提供一种Fc特异结合蛋白(IgG-Fc binding protein, FcBP)、IgG亲和层析介质及其制备方法与应用,所述的Fc特异结合蛋白能够特异性地结合IgG,所述的IgG亲和层析介质能够特异性结合IgG,并应用于偶联于不同的固相介质,从不同的组织液中分离、纯化IgG抗体,广泛地应用于制备有关试剂或有关抗体或抗原的检测。

[0009] 本发明提供一种Fc特异结合蛋白(IgG-Fc binding protein, FcBP),其包括3~6个重复的C2段,每个所述C2段之间含有1~12个亲水性氨基酸组成的多肽,所述C2段的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.4所示;所述的亲水氨基酸为选自甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸和谷氨酸中的一种或多种。

[0010] 所述的C2为G蛋白中与IgG抗体Fc特异结合的区域特异性结合的重复序列。

[0011] 较佳地,所述的Fc特异结合蛋白的羧基端还包括多肽,更佳地,所述的多肽为半胱氨酸构成的三肽(Cys)<sub>3</sub>。

[0012] 较佳地,所述的Fc特异结合蛋白的氨基端还包括用于特异性检测的标签,更佳地,所述的标签为组蛋白标签或Flag标签,最佳地为组蛋白标签。

[0013] 较佳地,所述的Fc特异结合蛋白的等电点为PI=4.73,分子量为26.9KDa。

[0014] 本发明中,所述的亲水氨基酸为选自甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸和谷氨酸中的一种或多种。较佳地,为选自甘氨酸和天冬酰胺的一种或两种。更佳地,每个所述C2段之间含有6~12个所述亲水性氨基酸组成的多肽,最佳地,每个所述C2段之间含有3~6个重复的甘氨酸-天冬酰胺二肽序列。

[0015] 较佳地,所述的Fc特异结合蛋白包括4个重复的C2段。

- [0016] 更佳地,所述的Fc特异结合蛋白的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2所示。
- [0017] 本发明所述的Fc特异结合蛋白的密码子经过优化,是适合大肠杆菌的密码子序列。
- [0018] 本发明提供一种Fc特异结合蛋白的基因,其核苷酸序列为编码所述的Fc特异结合蛋白的核苷酸序列。
- [0019] 较佳地,所述的Fc特异结合蛋白的基因的核苷酸序列为:
- [0020] 1) 序列表中SEQ ID No.3所示的核苷酸序列;或,
- [0021] 2) 编码氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2所示的蛋白质的核苷酸序列。
- [0022] 本发明所述的基因的制备方法为本领域常规,较佳地为从重组表达所述基因所编码的蛋白质的重组表达载体的质粒中扩增获得或人工合成获得。
- [0023] 本发明提供一种含有所述的Fc特异结合蛋白的基因的重组表达质粒。
- [0024] 所述的重组表达载体通过本领域常规方法将所述Fc特异结合蛋白基因连接于各种骨架载体上构建而成;较佳地,为由包括如下步骤的方法获得,通过PCR扩增获得的所述Fc特异结合蛋白的基因的扩增产物与载体连接,形成克隆载体,将所述克隆载体和所述骨架载体用限制性内切酶进行双酶切,形成互补的粘性末端,再经连接酶连接,即可。所述PCR扩增的模板为核苷酸序列如序列表中SEQ ID No.3所示的所述的Fc特异结合蛋白基因。所述PCR扩增的引物为本领域常规的引物,能够扩增出如序列表中SEQ ID No.3所示的所述的Fc特异结合蛋白基因即可。所述的载体为本领域常规的载体,较佳地为质粒pET23a。所述的限制性内切酶为本领域常规的内切酶,较佳地为Xho I和Nde I。较佳地,所述的重组表达载体的插入的核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.1所示。
- [0025] 本发明提供一种含有所述Fc特异结合蛋白的基因的重组表达质粒的转化子。
- [0026] 本发明所述转化子由通过本领域常规方法将所述重组表达载体转化至宿主微生物中制得;较佳地,将所述重组表达质粒转化至大肠杆菌BL21 (DE3) 中,即可。所述宿主微生物可为本领域常规的宿主微生物,只要能满足所述重组表达载体可稳定地自行复制,且所携带的所述的Fc特异结合蛋白的基因可被有效表达即可;较佳地为大肠杆菌,更佳地为大肠杆菌BL21 (DE3) 。
- [0027] 本发明提供一种制备所述的Fc特异结合蛋白的方法,其包括以下的步骤:培养所述的转化子,从培养物获得所述的Fc特异结合蛋白。
- [0028] 所述的转化子表达的方法为本领域常规的方法,较佳地为用IPTG诱导转化子表达。所述转化子的宿主细胞为本领域常规的宿主细胞,较佳地为大肠杆菌BL21 (DE3) 。
- [0029] 本发明提供一种所述的Fc特异结合蛋白在血液和组织液中IgG抗体或抗原的酶联免疫检测中的应用。
- [0030] 本发明提供一种IgG亲和层析介质,其包括固相介质和偶联在所述固体介质上的所述的Fc特异结合蛋白。
- [0031] 所述的固相介质为本领域常规的固相介质,较佳地为琼脂糖介质、酶标板或硝酸纤维素膜。更佳地,所述的琼脂糖介质为选自Aogarose 6B、Aogarose CL-4B、Aogarose CL-6B、Aogarose CL-2B、Aogarose 4FF或Aogarose 6FF中的一种或多种。
- [0032] 本发明提供一种制备所述IgG亲和层析介质的方法,其包括以下的步骤:
- [0033] (1)、清洗活化的固相介质,得到活化的固相介质;

[0034] (2)、所述的Fc特异结合蛋白与步骤(1)所得的活化的固相介质通过所述的活化的固相介质的羟基共价偶联,即可。

[0035] 步骤(1)为:清洗活化的固相介质,得到活化的固相介质。其中,所述的固相介质为本领域常规的固相介质,较佳地为琼脂糖介质;所述的活化为本领域常规的活化,较佳地,所述的活化为经环氧氯丙烷活化;所述的清洗为本领域常规的清洗,较佳地,为用去离子水清洗。

[0036] 步骤(2)为:所述的Fc特异结合蛋白与步骤(1)所得的活化的固相介质通过所述的活化的固相介质的羟基共价偶联,即可。其中,所述的偶联为本领域常规的偶联,较佳地,按如下的步骤进行偶联:将Fc特异结合蛋白与步骤(1)所得的活化的凝胶混合,22~37℃振荡3~6小时。较佳地,所述活化的凝胶为Aogarose CL-6B时,加入氨水反应2~4小时,再加入体积分数为10~15%的戊二醛水溶液反应1~2小时后再进行偶联。

[0037] 较佳地,所述的方法还包括如下的步骤:

[0038] (3)、封闭步骤(2)所得的IgG亲和层析介质中的活性基团,洗净,即可。

[0039] (4)、放置于0~10℃、体积分数20~30%的乙醇溶液中保存。

[0040] 步骤(3)为:封闭步骤(2)所得的IgG亲和层析介质中的活性基团,洗净,即可。其中,所述的封闭为本领域常规的封闭,较佳地,用偶联缓冲液清洗,所述偶联缓冲液为pH9.0,0.1M碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(10%0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>和90%0.1M NaHCO<sub>3</sub>,所述的百分比为体积百分比),再转入pH8.0 0.1M Tris-HCl溶液中22~30℃温育2小时。所述的活性基团为本领域常规的活性基团,较佳地,所述的活性基团为环氧基团,用1mol/L的乙醇胺溶液封闭。较佳地,所述的活性基团为醛基,用牛血清白蛋白(BSA)封闭。

[0041] 步骤(4)为:放置于0~10℃、体积分数20~30%的乙醇溶液中保存。其中,较佳地,放置于4℃、体积分数20%的乙醇溶液中保存。

[0042] 本发明提供一种所述的IgG亲和层析介质在IgG抗体分离和纯化中的应用。

[0043] 较佳地,所述的IgG抗体的来源为血液和组织液。

[0044] 本发明提供一种所述的IgG亲和层析介质在单克隆抗体分离和纯化中的应用。

[0045] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0046] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0047] 本发明的积极进步效果在于:所述的Fc特异结合蛋白具有以下优点:(1)氨基端含有组蛋白标签,可以通过与镍离子结合而纯化;(2)含有较高的亲和性和亲水性的IgG抗体Fc区域的结合域(C2段),整体的亲和力高;(3)C2段重复之间加入含有1~6个亲水性氨基酸组成的多肽连接部分,既保证各个C2段结合域之间的功能不互相干扰,还增加了Fc特异结合蛋白的水溶性,使重组表达时以可溶性蛋白的形式产生;(4)羧基端引入半胱氨酸构成的三肽(Cys)<sub>3</sub>,可以用于和琼脂糖连接集团之间的偶联。所述的IgG亲和层析介质能够特异性结合IgG,并应用于偶联于不同的固相介质,从不同的组织液中分离、纯化IgG抗体,广泛地应用于制备有关试剂或有关抗体或抗原的检测。

## 附图说明

[0048] 图1为重组表达的Fc特异结合蛋白(FcBP)的典型组成框图。

[0049] 图2为重组表达蛋白的SDS/PAGE (12%, 所述百分比为质量百分比) 检测。上样顺序:M;1诱导前菌体裂解上清液;2诱导后细菌体裂解上清液;3诱导后细菌体裂解沉淀。

[0050] 图3为重组蛋白液的SDS/PAGE (12%, 所述百分比为质量百分比) 检测。上样顺序:M为蛋白分子量标准;1为透析后1微升重组蛋白液;2为透析后2微升重组蛋白液;3为过滤后0.5微升重组蛋白液;4为过滤后1微升重组蛋白液;5为2微克BSA;6为4微克BSA;7为6微克BSA。

[0051] 图4为分离纯化的IgG2a进行SDS-PAGE电泳分析确定分离的抗体纯度。其中1和4为Uchl1抗原参照;2和3为纯化的小鼠抗人单克隆抗体。M为蛋白分子量标准;A表示纯化的IgG2a重链。

[0052] 图5为利用FcBP凝胶株对小鼠卵巢组织蛋白提取液UCHL1的免疫沉淀。其中1,2为卵巢蛋白提取液(总蛋白20微克);3无关IgG的对照;抗hUCHL1单抗IP,后用兔抗人UCHL1多抗检测显示的小鼠Uchl1条带。M为蛋白分子量标准;A表示UCHL1,B表示抗hUCHL1单抗IP。

### 具体实施方式

[0053] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0054] 实施例1Fc特异结合蛋白(FcBP)的制备

[0055] 1、含有重组质粒菌株的制备

[0056] 构建如图1所示Fc特异结合蛋白(FcBP),其包括4段C2重复,每段C2间有人工构建的(GN)<sub>3</sub>,即6个亲水氨基酸组成的多肽Gly Asn Gly Asn Gly Asn。人工合成核苷酸序列如序列SEQ ID NO.1所示的DNA片段,与重组表达pET-23a载体按摩尔比3:1混合,经过酶切反应,琼脂糖电泳分离纯化回收,然后经T4DNA连接,构成重组表达质粒,常规转染DE3感受态大肠杆菌株,获得氨苄青霉素抗性的单克隆菌落。经过扩增,获得用于表达的含有重组表达质粒DE3菌株。

[0057] 2、重组蛋白的诱导表达

[0058] 取10mL带有重组质粒细菌培养物,按1:50体积比例接种于500mL体积的2×YT培养液(内含100μg/ml Ampicillin),盛于1L锥形瓶,37℃扩增培养;A600达到1.0时,加入终浓度为0.5mM的IPTG,继续培养3小时。

[0059] 3、细菌的裂解

[0060] 4℃,5000g,离心10min,收集经诱导蛋白表达的大肠杆菌;弃上清,用裂解缓冲液(50mmol/L Tris-Cl(pH8.0),1mmol/L EDTA,100mmol/L NaCl)洗涤1遍,得湿菌。每克湿菌用3mL上述裂解缓冲液洗涤。500mL培养基中扩增获得5.6g湿菌。每克湿菌加入3mL上述裂解缓冲液重新悬浮沉淀;再加入终浓度为1mM PMSF和2μg/ml亮肽素,2μg/ml抑肽酶和10μg/ml胰蛋白酶抑制剂,混匀,

[0061] 冰上超声(超声10s,间隔20s,20次,功率约200w)至液体澄清不粘稠。4℃、12000g离心15min,收集上清液。上清液经0.45μm的无菌滤膜过滤,即得重组FcBP蛋白。

[0062] 4、表达蛋白的电泳检测

[0063] 取步骤3离心后所得的上清液200μl;将上清液和200μl沉淀混悬液,均分别加入50

$\mu\text{l}$  5 $\times$ 蛋白上样缓冲液(购自上海碧云天生物技术有限公司),于沸水中煮5min,离心,点上样10 $\mu\text{l}$ ,12%SDS-PAGE电泳分离,获得目的蛋白条带,所述百分比为质量百分比。上样后首先低压(100V)电泳10-15min,然后200V恒压电泳40min。用考马斯亮蓝R-250染色15min,脱色30min以显示凝胶上经电泳分离的蛋白条带,然后照相记录结果(如图2所示),图2的结果说明,表达的重组FcBP蛋白主要是可溶性的。

[0064] 5、His-tag蛋白的纯化

[0065] 1) His-tag蛋白纯化的凝胶柱准备

[0066] 采用2ml(柱体积CV=2ml)的Ni Aogarose 6FF凝胶(购自上海业力生物科技有限公司),装入直径2.5cm的层析柱中。装柱后,待液体流完后,依次用5倍柱体积H<sub>2</sub>O和5倍柱体积平衡缓冲液(20mM Tris-HCl,pH7.4,100mM NaCl,10mM咪唑)处理凝胶,平衡好的凝胶以待使用。

[0067] 2) 吸附细菌裂解液中FcBP蛋白

[0068] 将步骤1)所得的平衡好的凝胶加入到步骤3离心后所得的上清液中,将所得的混合物在4 $^{\circ}\text{C}$ 层析柜的混匀器上混匀30min,即得吸附有重组蛋白的凝胶珠。

[0069] 3) 装柱

[0070] 把步骤2)所得的吸附有重组蛋白的凝胶株加入层析管,将层析柱的下端打开,让未结合的蛋白随液体流出,收集流穿液,再反复上柱。

[0071] 4) 洗涤非特异吸附的蛋白

[0072] 用10ml的20mM咪唑(溶解在20mM Tris-HCl,pH 7.4,500mM NaCl中)洗脱非特异吸附的蛋白,自然流速洗脱,每1mL收集一次。用Bradford液(30mL Bradford母液(100mL 95%乙醇;200mL 88%磷酸;350mg Serva G蓝)、425mL双蒸水;15mL 95%乙醇;30mL 88%磷酸)检测洗涤液,洗涤至洗涤液中无蛋白,检测液变蓝。

[0073] 5) 目的蛋白FcBP的洗脱

[0074] 分别用10mL的50mM、250mM、200mM的咪唑(咪唑溶解在20mM Tris-HCl,pH 7.4,100mM NaCl中)洗脱目的蛋白,自然流速洗脱,每1mL收集一次。洗脱蛋白液混合在一起,置入透析袋(截留分子量2kD),在重组蛋白裂解缓冲液中透析24小时,然后对获得截留的蛋白液置超滤管(截留分子量5kD),超滤1小时,获得有关的蛋白液。

[0075] 6) 经过纯化的蛋白溶液的检测

[0076] 12%SDS-PAGE检测方法如上,获得蛋白液上样量,结果如图3所示,图3说明经过His-Tag亲和纯化的蛋白接近单一条带(26kD),纯化后蛋白浓度约为4mg/mL,所述的百分比为质量百分比。经检测后发现,所获得的纯化的FcBP蛋白的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.2所示。

[0077] 实施例2FcBP亲和层析柱的制备

[0078] 环氧活化琼脂糖凝胶(Epoxy activated Aogarose 6B购自上海业力生物科技有限公司),该介质可用于各种含有氨基、巯基或羟基的亲配基(蛋白质、多肽、糖等)的偶联。重组表达的FcBP可以借助C端三个Cys氨基酸残基的巯基牢固与该介质结合。具体的操作步骤如下(以10mL活化胶偶联BSA为例):

[0079] 1) 清洗活化的凝胶

[0080] 用10倍胶体积的去离子水冲洗保存于50%DMSO的环氧活化琼脂糖凝胶,除去

DMSO, 抽干。

[0081] 2) 将FcBP偶联于凝胶

[0082] 将200mg实施例1所制备的FcBP蛋白溶解于10ml 0.1M碳酸钠缓冲液 (pH 9.0), 加入到步骤1) 所得抽干的活化的环氧活化琼脂糖凝胶中, 在摇床上振荡, 37℃ 偶联24h, 反应完毕后, 将所得的料液转移到砂芯漏斗中抽干, 收集料液, 进一步水洗、抽干, 得偶联FcBP的活化的环氧活化琼脂糖凝胶。

[0083] 3) 封闭凝胶的活性偶联臂

[0084] 将10mL步骤2) 所得的偶联FcBP的活化的环氧活化琼脂糖凝胶加入到100mL三角瓶中, 加入30mL 1mol/L乙醇胺溶液。反应温度恒定在37℃, 搅拌速度120rpm, 反应时间4h。反应停止后将料液转移到砂芯漏斗中抽干, 用去离子水清洗, 得偶联FcBP的介质。

[0085] 4) 清洗凝胶柱

[0086] 将步骤3) 所得的偶联FcBP的介质依次用5倍体积的去离子水、0.1M含0.5M NaCl的乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 4.0)、去离子水、0.1M含0.5M NaCl的硼酸-四硼酸钠缓冲液 (pH 8.0) 和去离子水充分洗涤后, 抽干。

[0087] 5) 凝胶柱的保存

[0088] 保存于4℃、20%乙醇溶液中, 所述的百分比为体积百分比。

[0089] 实施例3利用重组蛋白FcBP亲和层析柱从腹水中分离纯化小鼠抗人源蛋白单克隆抗体IgG

[0090] 1) 磷酸缓冲液配制

[0091] 使用的磷酸缓冲液配制方法如下。

[0092] 缓冲液A: 1mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (MW358.14) 358.14g

[0093] 1500mM NaCl (MW68.08) 87.7g

[0094] 溶于1升水, 滤膜过滤。

[0095] 缓冲液B: 1mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (MW156.01) 156.01g

[0096] 1500mM NaCl (MW68.08) 87.7g

[0097] 溶于1升水, 滤膜过滤

[0098] 缓冲液C:

[0099] 取缓冲液A 35.2ml、缓冲液B 64.8ml, 再加900ml水, 混合后pH6.5, 加吐温-20至终浓度0.05%。

[0100] 中和缓冲液D: 缓冲液A 77.4ml、缓冲液B 22.6ml; 两液混合成pH7.4的中和缓冲液

[0101] 洗脱液E: 0.1mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (MW156.01) 15.601g

[0102] 150mM NaCl (MW68.08g/mol) 8.77g

[0103] 溶于1升水, 滤膜过滤, HCl调整pH至3.0

[0104] 2) 凝胶柱的准备与平衡

[0105] 将实施例2所制得的重组蛋白FcBP琼脂糖凝胶装柱, 柱床体积为1ml, 使用保存液 (体积分数20%的乙醇溶液) 流尽, 然后以10倍柱床体积的缓冲液C平衡, 流速为1mL/min。

[0106] 3) 将小鼠腹水制备与上柱

[0107] 按照常规方法 (参考房国梁. 蛋白G的IgG Fc段结合域克隆、表达及功能研究. 2010. 武汉工业学院硕士论文; Bjorck L, Kastern W, Lindahl G, et al. Streptococcal

protein G, expressed by streptococci or by Escherichia coli, has separate binding sites for human albumin and IgG. Mol Immunol, 1987, 24(10):1113-1122.) 制备含有IgG2a亚型针对人UCHL1 (ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1) 的单克隆抗体的小鼠腹水。将0.2mL上述小鼠腹水用缓冲液C稀释到2ml, 用0.45 $\mu$ m滤膜过滤, 上样, 流速为1ml/min。

[0108] 4) 洗涤非特异性结合蛋白

[0109] 再用5倍柱床体积的缓冲液C流洗, 流速为1mL/min。

[0110] 5) 以IgG2a为克隆抗体洗脱

[0111] 用5倍柱床体积的洗脱液E流洗。在获得的洗脱液中加入0.2倍洗脱液E体积的中和缓冲液D, 以pH试纸确认溶液为中性。

[0112] 6) 检测纯化的IgG2a

[0113] 将分离纯化的IgG2a, 进行SDS-PAGE电泳分析确定分离的抗体纯度, 结果见图4。图4的结果说明, 固定于琼脂糖介质的FcBP可以特异性结合腹水中的单克隆抗体, 说明其不仅可以用于制备有关的IgG类的抗体作为化学试剂, 而且有可能用于制备IgG抗体类药物。

[0114] 7) FcBP亲和凝胶柱的洗涤与保存。

[0115] 用10倍柱床体积的水流洗, 再用10倍柱床体积的20%的乙醇流洗, 流速为2mL/min, 流洗后的柱子置于4~8 $^{\circ}$ C环境中保存, 以备再次用于分离抗体IgG。

[0116] 实施例4免疫沉淀

[0117] (1) 蛋白样品的准备

[0118] 颈椎脱臼处死8周雌性小鼠, 手术取出卵巢。每100mg卵巢组织蛋白加入蛋白提取缓冲液1mL (蛋白提取缓冲液包括50mM 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液 (pH=7.5)、100mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、50mM NaF、1mM EDTA、1mM EGTA、10 $\mu$ g/ml大豆胰蛋白酶抑制剂、10 $\mu$ g/ml亮肽素、10 $\mu$ g/ml抑肽酶和1mM PMSF), 冰上彻底碾碎卵巢组织。组织匀浆液于4 $^{\circ}$ C静置2小时。4 $^{\circ}$ C、12,000rpm/min离心20分钟, 取上清, 即为卵巢蛋白提取液。

[0119] (2) 去除非特异性结合

[0120] 取200微升卵巢蛋白提取液, 其中总蛋白量为200微克, 加入2微克小鼠IgG (购自上海碧云天生物技术有限公司), 其与抗人UCHL1的IgG无交叉反应, 20微升充分重悬实施例2所得的FcBP亲和凝胶柱, 4 $^{\circ}$ C缓慢摇动1小时。2500rpm离心5分钟, 取上清用于后续的免疫沉淀。

[0121] (3) 免疫沉淀

[0122] 1) 向步骤(2)所得的上清中加入2微克实施例3步骤3中所得的含有IgG2a亚型针对人UCHL1的单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C缓慢摇动过夜。

[0123] 2) 再加入40微升充分重悬的FcBP亲和凝胶柱, 4 $^{\circ}$ C缓慢摇动2个小时。

[0124] 3) 2500rpm离心5分钟, 小心吸除上清。

[0125] 4) 用蛋白提取液洗涤沉淀5次, 每次用量为1毫升。

[0126] 5) 完成最后一次洗涤后, 去除上清, 加入20微升1 $\times$ SDS/PAGE电泳上样缓冲液重悬, 洗脱吸附的抗体与蛋白, 沸水浴处理4分钟, 离心取上清10微升作为样品, 用于SDS/PAGE电泳。结果见图5。图5的结果说明, 实施例2所得的偶联FcBP的介质可以特异结合IgG, 而且不影响抗体IgG识别其抗原UCHL1, 即能够从组织蛋白提取液中特异分离出相应的抗原。而

对照抗体IgG虽然和FcBP结合,但是不能识别目标抗原UCHL1。因此,获得实施例2所得的偶联FcBP的介质(即IgG亲和层析介质),既可以用于免疫沉淀反应,分离抗体和抗原复合物,也可以用于有关抗原的检测。

[0127] 实施例5FcBP用于人卵泡液中FSHR抗体IgG的酶联免疫检测

[0128] 1) 包被

[0129] 用0.05M pH9碳酸盐包被缓冲液( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 1.59g, $\text{NaHCO}_3$ 2.93g,加蒸馏水至1000mL)将重组的FcBP蛋白稀释至蛋白质含量为1~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,作为酶标抗体。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加0.1ml,4 $^\circ\text{C}$ 过夜。次日,弃去反应孔内溶液,用PBS缓冲液(0.01M PBS 1L配方pH7.4:磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )0.24g,磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )1.44g,氯化钠( $\text{NaCl}$ )8.0g,氯化钾( $\text{KCl}$ )0.2g,加水至1000mL)洗涤3次,每次3分钟(简称洗涤,下同)。

[0130] 2) 加样

[0131] 加一定稀释的待检样品0.1ml于上述已包被之反应孔中,置37 $^\circ\text{C}$ 孵育1小时。然后洗涤。并设置空白孔,阴性对照孔及阳性对照孔。以同体积的PBS缓冲液作阴性对照,小鼠IgG(购自上海碧云天生物技术有限公司)作为阳性对照。

[0132] 3) 加酶标抗体

[0133] 于各反应孔中,加入经稀释的过氧化物酶标记二抗兔抗人IgG(购自武汉博士德生物工程有限公司)酶标抗体0.1mL,用PBS稀释至原体积浓度的1/1000。37 $^\circ\text{C}$ 孵育0.5~1小时,洗涤。

[0134] 4) 加底物液显色

[0135] 于各反应孔中加入配制的TMB底物溶液(购自Thermo Scientific)0.1ml,37 $^\circ\text{C}$ 反应10~30分钟。

[0136] 5) 终止反应

[0137] 于各反应孔中加入0.05ml 2M硫酸终止反应。

[0138] 6) 酶标仪读数与结果分析

[0139] 在ELISA检测仪上,于450nm波长,将空白对照孔调零后,测各孔A450值,若样品孔A450高于阴性对照的2.1倍,即可判断为阳性。结果表明,在人卵泡液中含有IgG。

[0140] 实施例6FcBP亲和层析柱的制备

[0141] 环氧活化琼脂糖凝胶(Epoxy activated Aogarose 6B购自上海业力生物科技有限公司),具体的操作步骤如下(以10mL活化胶偶联BSA为例):

[0142] 1) 清洗活化的凝胶

[0143] 用10倍胶体积的去离子水冲洗保存于50%DMSO的环氧活化琼脂糖凝胶,除去DMSO,抽干。

[0144] 2) 将FcBP偶联于凝胶

[0145] 将200mg实施例1所制备的FcBP蛋白溶解于10ml 0.1M碳酸钠缓冲液(pH 9.0),加入到步骤1)所得抽干的活化的环氧活化琼脂糖凝胶中,在摇床上22 $^\circ\text{C}$ 振荡6小时,加入氨水反应2小时,再加入体积分数为10%的戊二醛水溶液反应2小时后,37 $^\circ\text{C}$ 偶联24h,反应完毕后,将所得的料液转移到砂芯漏斗中抽干,收集料液,进一步水洗、抽干,得偶联FcBP的活化的环氧活化琼脂糖凝胶。

[0146] 3) 封闭凝胶的活性偶联臂

[0147] 将10mL步骤2)所得的偶联FcBP的活化的环氧活化琼脂糖凝胶加入到100mL三角瓶中,加入30mL 1mol/L乙醇胺溶液。反应温度恒定在37℃,搅拌速度120rpm,反应时间4h。反应停止后将料液转移到砂芯漏斗中抽干,用去离子水清洗,得偶联FcBP的介质。

[0148] 4) 清洗凝胶柱

[0149] 将步骤3)所得的偶联FcBP的介质依次用5倍体积的去离子水、0.1M含0.5M NaCl的乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 4.0)、去离子水、0.1M含0.5M NaCl的硼酸-四硼酸钠缓冲液(pH 8.0)和去离子水充分洗涤后,抽干。

[0150] 5) 凝胶柱的保存

[0151] 保存于0℃、20%乙醇溶液中,所述的百分比为体积百分比。

[0152] 实施例7FcBP亲和层析柱的制备

[0153] 环氧活化琼脂糖凝胶(Epoxy activated Agarose 6B购自上海业力生物科技有限公司),具体的操作步骤如下(以10mL活化胶偶联BSA为例):

[0154] 1) 清洗活化的凝胶

[0155] 用15倍胶体积的去离子水冲洗保存于50%DMSO的环氧活化琼脂糖凝胶,除去DMSO,抽干。

[0156] 2) 将FcBP偶联于凝胶

[0157] 将200mg实施例1所制备的FcBP蛋白溶解于10ml 0.1M碳酸钠缓冲液(pH 9.0),加入到步骤1)所得抽干的活化的环氧活化琼脂糖凝胶中,在摇床上37℃振荡3小时,加入氨水反应4小时,再加入体积分数为15%的戊二醛水溶液反应1小时后,37℃偶联24h,反应完毕后,将所得的料液转移到砂芯漏斗中抽干,收集料液,进一步水洗、抽干,得偶联FcBP的活化的环氧活化琼脂糖凝胶。

[0158] 3) 封闭凝胶的活性偶联臂

[0159] 将10mL步骤2)所得的偶联FcBP的活化的环氧活化琼脂糖凝胶加入到100mL三角瓶中,偶联缓冲液为pH9.0,0.1M碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(10%0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>和90%0.1M NaHCO<sub>3</sub>,所述的百分比为体积百分比),再转入pH8.00.1M Tris-HCl溶液中30℃温育2小时。反应停止后将料液转移到砂芯漏斗中抽干,用去离子水清洗,得偶联FcBP的介质。

[0160] 4) 清洗凝胶柱

[0161] 将步骤3)所得的偶联FcBP的介质依次用5倍体积的去离子水、0.1M含0.5M NaCl的乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 4.0)、去离子水、0.1M含0.5M NaCl的硼酸-四硼酸钠缓冲液(pH 8.0)和去离子水充分洗涤后,抽干。

[0162] 5) 凝胶柱的保存

[0163] 保存于10℃、30%乙醇溶液中,所述的百分比为体积百分比。

[0164] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不构成对权利要求范围的限制,本领域内技术人员可以想到的其他实质上等同的替代,均在本发明保护范围内。

	<110>	上海业力生物科技有限公司	
	<120>	Fc 特异结合蛋白、IgG 亲和层析介质及其制备方法与应用	
	<130>	P1510172C	
	<160>	4	
	<170>	PatentIn version 3.5	
	<210>	1	
	<211>	771	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	重组 DNA	
	<400>	1	
		atatacatat gcaccaccac caccaccacg gtacttataa attagttatt aacggtaaaa	60
[0001]		ctttaaaagg tgaaactact actgaagctg ttgatgctgc tactgctgaa aaagttttca	120
		aacaatatgc taacgataac ggtgttgatg gtgaatggac ttatgatgat gctactaaaa	180
		ctttcactgt tactgaaggt aacggtaacg gtaacactta taaattagtt attaacggta	240
		aaactttaaa aggtgaaact actactgaag ctgttgatgc tgctactgct gaaaaagttt	300
		tcaaacaata tgctaacgat aacggtgttg atggtgaatg gacttatgat gatgctacta	360
		aaactttcac tgttactgaa ggtaacggta acggtaacac ttataaatta gttattaacg	420
		gtaaaacttt aaaaggtgaa actactactg aagctgttga tgctgctact gctgaaaaag	480
		ttttcaaaca atatgctaac gataacggtg ttgatggatg atggacttat gatgatgcta	540
		ctaaaacttt cactgttact gaaggtaacg gtaacggtaa cacttataaa ttagttatta	600
		acggtaaaac tttaaaaggt gaaactacta ctgaagctgt tgatgctgct actgctgaaa	660
		aagttttcaa acaatatgct aacgataacg gtgttgatgg tgaatggact tatgatgatg	720
		ctactaaaac tttcactggt actgaatggt gttggtgaat aactcgagac a	771

<210> 2  
 <211> 248  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重组 FcBP 蛋白

<400> 2

His His His His His His Gly Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys  
 1                    5                    10                    15

Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala  
                   20                    25                    30

Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu  
                   35                    40                    45

[0002]

Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Gly Asn  
                   50                    55                    60

Gly Asn Gly Asn Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys  
 65                    70                    75                    80

Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val  
                   85                    90                    95

Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr  
                   100                    105                    110

Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Gly Asn Gly Asn Gly  
                   115                    120                    125

Asn Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr  
 130                    135                    140

[0003]

Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln  
 145 150 155 160

Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala  
 165 170 175

Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Gly Asn Gly Asn Gly Asn Thr Tyr  
 180 185 190

Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu  
 195 200 205

Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn  
 210 215 220

Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr  
 225 230 235 240

Phe Thr Val Thr Glu Cys Cys Cys  
 245

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 744

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FcBP 基因

&lt;400&gt; 3

caccaccacc accaccacgg tacttataaa ttagttatta acggtaaaac tttaaaaggt 60

gaaactacta ctgaagctgt tgatgctgct actgctgaaa aagttttcaa acaatatgct 120

aacgataacg gtgttgatgg tgaatggact tatgatgatg ctactaaaac tttcactggt 180

[0004]

actgaaggta acggtaacgg taacacttat aaattagtta ttaacggtaa aactttaaaa 240  
 ggtgaaacta ctactgaagc tgttgatgct gctactgctg aaaaagtttt caaacaatat 300  
 gctaacgata acggtggtga tggatgaatgg acttatgatg atgctactaa aactttcact 360  
 gttactgaag gtaacggtaa cggtaacact tataaattag ttattaacgg taaaacttta 420  
 aaaggtgaaa ctactactga agctggtgat gctgctactg ctgaaaaagt tttcaaacaa 480  
 tatgctaacg ataacggtgt tgatggtgaa tggacttatg atgatgctac taaaactttc 540  
 actgttactg aaggtaacgg taacggtaac acttataaat tagttattaa cggtaaaaact 600  
 ttaaaaggtg aaactactac tgaagetggt gatgctgcta ctgctgaaaa agttttcaaa 660  
 caatatgcta acgataacgg tgttgatggt gaatggactt atgatgatgc tactaaaact 720  
 ttcactgtta ctgaatggtg ttgt 744

- <210> 4
- <211> 55
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> C2

- <400> 4

Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr  
 20 25 30

Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr  
 35 40 45

Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu  
 50 55

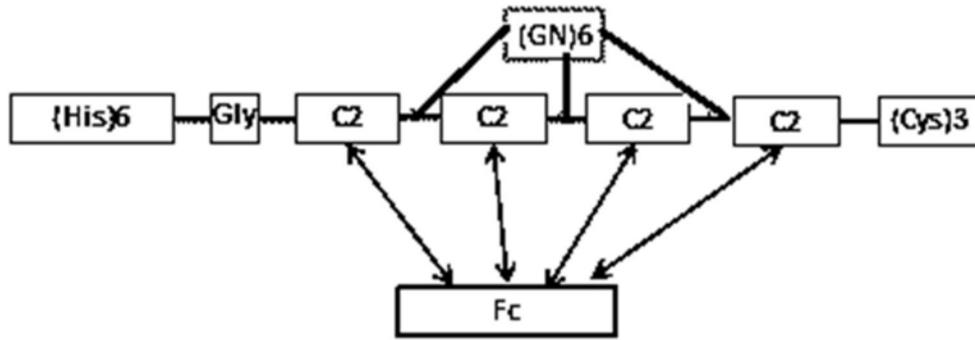


图1

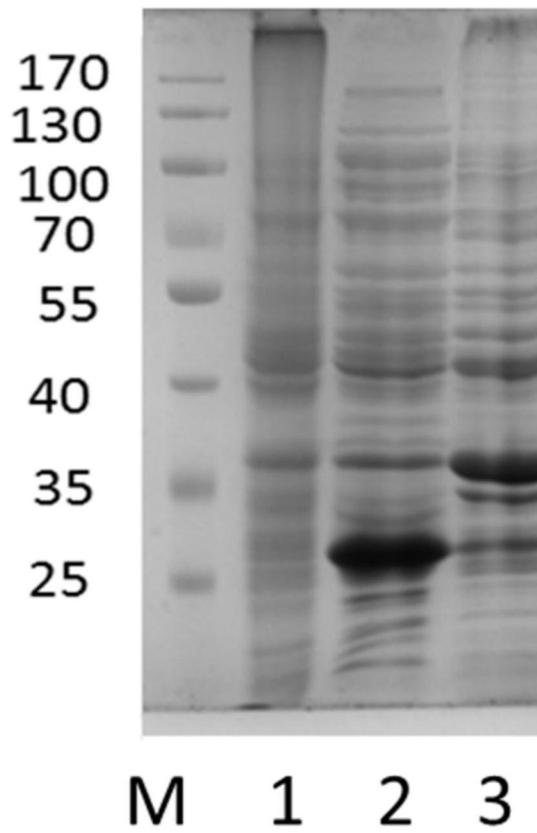


图2

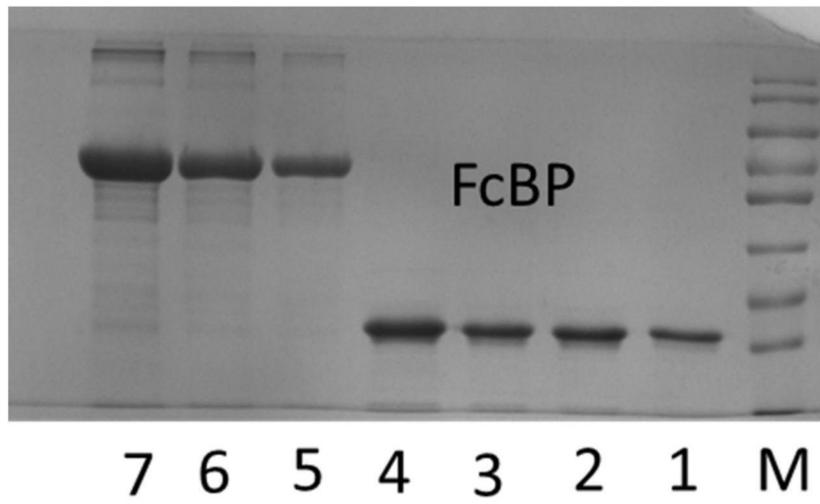


图3

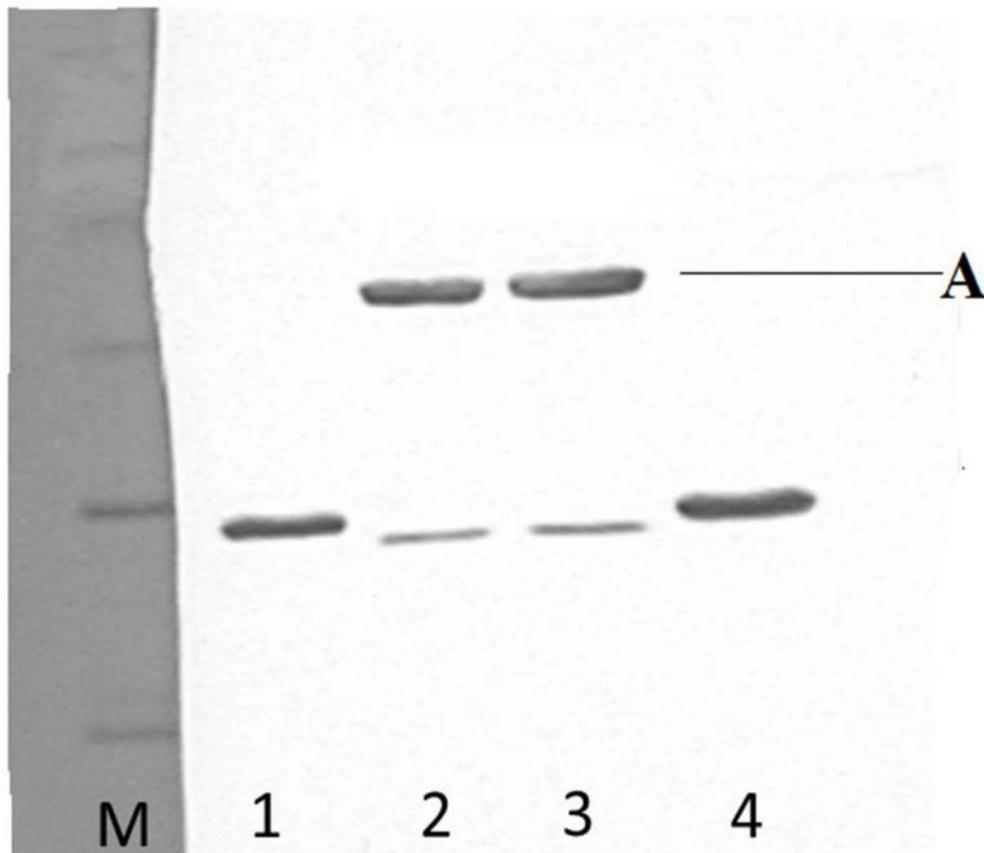


图4

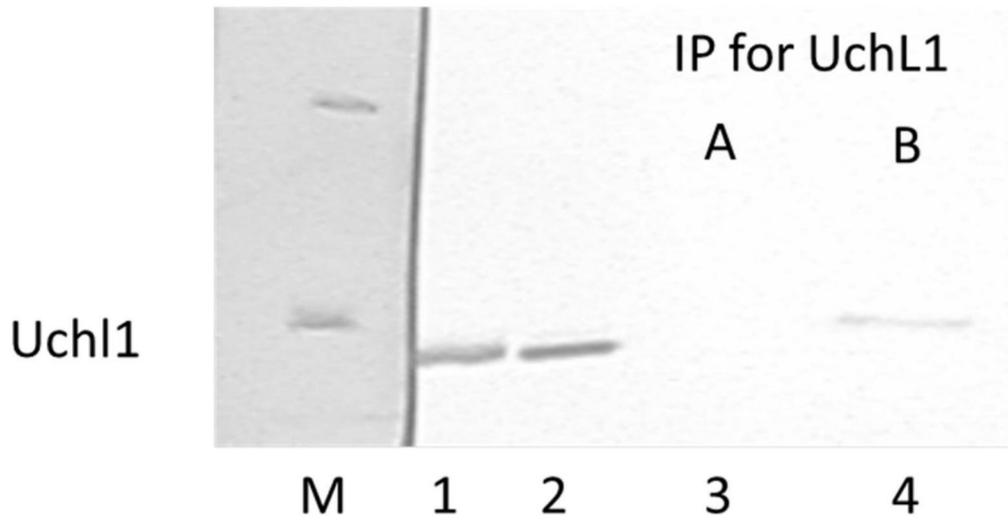


图5