

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/

[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/10 C12N 15/

G01N 33/68 C12Q 1/

[21] 申请号 99127339.7

[43] 公开日 2001 年 7 月 4 日

[11] 公开号 CN 1301772

[22] 申请日 1999.12.30 [21] 申请号 99127339.7

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

[72] 发明人 刘 伟 薛志刚 薛金晓

刘 纓 赫荣乔

[74] 专利代理机构 上海华东专利事务所

代理人 李 柏

权利要求书 4 页 说明书 10 页 附图页数 3 页

[54] 发明名称 特异性识别发育调控蛋白 qBm - 2 的抗体及其制备方法和用途

[57] 摘要

本发明属于遗传工程,特别涉及特异性识别发育调控蛋白 qBm - 2 的抗体及其制备方法和用途。以重组多肽或化学合成多肽为抗原免疫哺乳动物获得的多克隆抗体,这一抗体对发育调控蛋白 qBm - 2 的识别位点为 qBm - 2 的 N - 末端的非保守性的氨基酸序列,该抗体不识别其它 POU 结构域蛋白;在 Western 印记实验中,该抗体特异地识别单一的蛋白;利用免疫组织化学接示的 qBm - 2 表达模式与分子原位杂交的结果高度一致。该抗体可以用于研究发育调控蛋白 qBm - 2 及其同源蛋白的结构、功能及在胚胎发育中的调控作用。

权利要求书

1. 一种特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 的抗体, 其特征在于: 是一个以重组多肽或化学合成多肽为抗原免疫哺乳动物获得的多克隆抗体, 这一抗体对发育调控蛋白 qBrn-2 的识别位点为 qBrn-2 的 N-末端的非保守性的氨基酸序列, 该抗体不识别其它 POU 结构域蛋白; 在 Western 印记实验中, 该抗体特异地识别单一的蛋白; 利用免疫组织化学接示的 qBrn-2 表达模式与分子原位杂交的结果高度一致。

2. 如权利要求 1 所述的特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 的抗体, 其特征在于所述的重组多肽是选取 qBrn-2 的 cDNA 的 POU 盒上游区或化学合成的 cDNA, 经基因重组表达和纯化, 得到的多肽或融合多肽; 或按照 qBrn-2 的 cDNA 的 POU 盒上游区所编码的氨基酸序列化学合成的多肽或融合多肽。

3. 如权利要求 2 所述的特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 的抗体, 其特征在于所述的选取 qBrn-2 的 cDNA 的 POU 盒上游区或化学合成的 cDNA 是指 qBrn-2 的 cDNA 或化学合成的-4~621 片段。

4. 如权利要求 3 所述的特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 的抗体, 其特征在于所述的选取 qBrn-2 的 cDNA 或化学合成的-4~621 片段的序列及其编码氨基酸序列为:

```
AGTCATGGCGACCGCAGCCTCCAACCACTACAGC
M A T A A S N H Y S
53 CTGCTCGCCTCCGGCTCGCCCATGGTGCACGCCGAGCCCGCCGGCCATGCAGCCCGGC 10
L L A S G S P M V H A E P P G G M Q P G 30
113 GGAGGCTACCGCGACCGGGCGCGCTGGTGCAGGCGGACTACGCGCTGCAGAGCAACGGG
G G Y R D A G A L V Q A D Y A L Q S N G 50
173 CACCCGCTGAGCCACGCTCACCAGTGGATCGCCGCGCTGTCCACGGCGGCCCGGGCGGC
H P L S H A H Q W I A A L S H G G P G G 70
233 GGCGGCGGAGGAGGGGGCGGGCGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G 90
293 GCGGCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGG
A A A A A A A A A G A L G P P D I K P A A 110
353 GTGCAGGCGGCCCCCGCGCGGGCAGCAGCTGCCCGCCCTCCGCAGCACCCGCGCCCGCCG
V Q A A P R G D E L P P P P Q H P P P P 130
413 GGCCGAGCCCCGCACCTGGTGCACCACGGCGGAGGGCGGAGGGCGGAGGGCGGAGGGCGG
G R A P H L V H H G G G G G G G G H H A A W 150
473 CGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGG
R A G G A A H L P P G M A A A N G A A Q 170
533 GCGGGGCTGTGTACCCGCAGCCGCCCGGCTTCACCGTGAACGGCATGTTGGGCGCCGCG
A G L L Y P Q P P G F T V N G M L G A A 190
593 CAGCCGCCCCTGCACCACCAGGCCCTCCGCGACGCCACGACGAGGCTCCC
Q P A L H H H G L R D A H D E A P 207
```

5. 如权利要求 2 所述的特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 的抗体, 其特征在于所述的 qBrn-2 的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列为:

```

1          GCGAGCAGAGCGCGCGGAGTCATGGCGACCGCAGCCTCCAACCACTACAGC
                                     M A T A A S N H Y S      10
53  CTGCTCGCCTCCGGCTCGCCCATGGTGCACGCCGAGCCGCCCGCGGCATGCAGCCCGGC
L L A S G S P M V H A E P P G G M Q P G      30
113 GGAGGCTACCGCGACGGGGCGCGCTGGTGCAGGCGGACTACCGCTGCAGAGCAACGGG
G G Y R D A G A L V Q A D Y A L Q S N G      50
173 CACCCGCTGAGCCACGCTCACCAGTGGATCGCCGCGCTGTCCACGGCGGCCCGCGGCG
H P L S H A H Q W I A A L S H G G P G G      70
233 GCGCGCGGAGGAGGGGGCGCGCGCGGAGGGGGCGCGGAGGCGCGGAGGCTCCCTGG
G G G G G G G G G G G G G G G G E A P W      90
293 GCGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGGGCCCGCCCGACATCAAGCCGGCCCGG
A A A A A A A A G A L G P P D I K P A A      110
353 GTGCAGGCGGCCCGCGCGCGCGCGCTGCCCGCCCGCAGCACC CGCCCGCGCGCG
V Q A A P R G D E L E P P P Q H P P P P      130
413 GGCCGAGCCCGCACCTGGTGCACCACGGCGCGGAGGGCGCGGCGCACACGCGCGCGTGG
G R A P H L V H H G G G G G G H H A A W      150
473 CGGGCGGGCGCGCGCGCGCACCTGCCCGCGGGCATGGCCCGGCCAACGGAGCGGCGCAG
R A G G A A H L P P G M A A A N G A A Q      170
533 GCGGGGCTGCTGTACCCGCGAGCCGCCCGCGCTCACCGTGAACGGCATGTTGGGCGCCGCG
A G C L L Y P Q P P G F T V N G M L G A A      190
593 CAGCCCGCCCTGCACCACCGCCCTCCGCGAGTCCCGCACGAGGCTCCCGGCGCGCC
Q P A L H H H G L R D A H D E A P G P P      210
653 GCGCCCGCGCACCCAGCGCGCGGAGCACCCGACGGGCGCACCCCGGGCGGAGCGGGG
A P P H H G A E H P H G P H P A G G A G      230
713 CCGGGGGCGCGGAGCGGGCGCGGAGGGCGCGCACCGAGGCGCACTCGGACGAG
P G G G G A A A A G G P H H E A H S D E      250
773 GACACGCCGACCTCG
D T P T S      270
833
893
953
1013 ACCAGCATAGACAAGATCGCGGCGCAG
T S I D K I A A Q      350
1073
1133
1193 ATGACGCCCGCGGGGGGACGCTGCCGGGCGCC
M T P P G G T L P G A      410
1253 GAGGACGTGTACGGGCCAGCAGGGACACGCCCGCGCACCGGGTGCAGACCCCGTG
E D V Y G P S R D T P P H H G V Q T P V      430
1313 CAGTGACCTGGGCGCCCTCATTCCCCCCCCCTTCTCCTCCTCCTCCTCCCCCGCCT
Q *      431
1373 TTCCGGCGTCTCCTTTCAGTGTGGGGTTCCTTTTGTGGTTTATTTTTTCTTTGTT
1433 TTTAATTTTCTCCTCTCTTTCAAAAAAAAAAAAAA

```

6. 如权利要求 1-5 所述的一种特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 抗体的制备方法, 其特征在于该方法包括:

- (1). 选取 qBrn-2 的 POU 盒上游区或化学合成的 cDNA, 构建表达质粒;
- (2). 将表达质粒导入宿主系统进行表达, 经纯化获得电泳纯重组多肽;
- (3). 以这一电泳纯重组多肽为抗原, 免疫哺乳动物获得特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 的抗体, 命名为 anti-qBrn-2。

7. 如权利要求 6 所述的特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 抗体的制备方法, 其特征在于所述的 qBrn-2 的 POU 盒上游区是指发育调控蛋白 qBrn-2 的 1~207 个氨基酸的编码序列。

8. 如权利要求 6 所述的特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 抗体的制备方法, 其特征在于所述的将表达质粒导入宿主系统进行表达是指将 pET 导入 BL21(DE3); 所述的电泳纯重组多肽的纯化是利用其 N-末端添加 His-tag, 用 Ni⁺⁺-chelating Sepharose 4B 分离纯化。

9. 如权利要求 8 所述的特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 抗体的制备方法, 其特征在于所述的 pET 是指 pET 3b 207 或 pHis 207。

10. 如权利要求 9 所述的特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 抗体的制备方法, 其特征在于所述的表达质粒 pET 3b 207 的构建是用 HinfI 和 SmaI 酶切 qBrn-2 cDNA, 取其位置位于-4~621 的 HinfI-SmaI 片段, 用 Klenow DNA 聚合酶将末端补平, 连接 12 mer 的 BamHI linker; 经 BamHI 酶切后, 将这一片段克隆至 pET 3b 的 BamHI 位点, 形成表达质粒 pET 3b 207; 所述的表达质粒 pHis 207 的构建, 是用 pET 28a 的 XbaI-NdeI 片段置换 pET 3b 207 的 XbaI-NdeI 片段, 形成表达质粒 pHis 207, 这样就在表达质粒 pHis 207 的 N-末端添加了 His-tag 编码区。

11. 如权利要求 8 所述的特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 抗体的制备方法, 其特征在于所述的重组多肽的表达是将 pET 3b 207 或 pHis 207 用 CaCl₂ 法转化 BL21(DE3) 菌株, 用 LB 37°C 液体培养; 当 OD₆₀₀=0.6~0.8 时, 加入终浓度为 0.05~0.4mM 的 IPTG, 继续培养 2~3 小时, 离心收集菌体; pHis 207 所表达蛋白的纯化是用添加蛋白酶抑制剂的磷酸缓冲液悬浮菌体, 其中磷酸缓冲液的 pH 7.3, aprotinin 1 μg/ml, PMSF 100 μg/ml; 每 1 升培养液用 50ml 缓冲液悬浮, 于冰浴中超声裂解菌体; 随后, 加入终浓度为 1% 的 Triton X-100, 轻轻搅拌均

匀 30 分钟；离心取上清，其中离心条件温度为 4°C，转速为 10000 rpm，用 Ni²⁺-chelating Sepharose 4B 柱亲和吸附，用 40 mM 咪唑洗脱除去杂蛋白；然后收集 200 mM 咪唑洗脱组分，透析，冰冻干燥获得电泳纯重组多肽。

12. 如权利要求 6 所述的特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 抗体的制备方法，其特征在于所述的哺乳动物是新西兰白兔、小鼠、大鼠、荷兰猪、山羊、绵羊、马或牛。

13. 如权利要求 6 所述的特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 抗体的制备方法，其特征在于所述的免疫过程为将获得的电泳纯重组多肽作抗原，免疫 8 周龄新西兰白兔，多点皮下注射；首次免疫时，每只兔子使用的剂量为将 1.0 mg 电泳纯重组多肽，溶解在 1.0 ml 磷酸缓冲液中，添加 1.0 ml 弗氏完全作剂，充分混匀的混合物；28 天后，加强免疫，每只兔子使用的剂量为将 0.5 mg 电泳纯重组多肽，溶解在 1.0 ml 磷酸缓冲液中，添加 1.0 ml 弗氏不完全作剂，充分混匀的混合物；两周后使用加强免疫的方法再次加强免疫；第二次加强免疫 10 天后开始取耳缘静脉血检测效价，收集适合 Western 印记实验和免疫组织化学实验的抗血清，分装，于-80°C 冻存。

14. 如权利要求 1-5 所述的一种特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 抗体的用途，其特征在于该抗体特异性识别神经发育调控蛋白 qBrn-2 及其同源蛋白，用于研究 qBrn-2 在胚胎发育中的表达模式和发育中的调控作用；研究 qBrn-2 与其靶 DNA 的相互作用及其与 qBrn-2 协同蛋白的相互作用。

15. 如权利要求 14 所述的一种特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 抗体的用途，其特征在于所述的特异性识别的方式是通过酶、生物素、荧光素、生色化学基团、放射性同位素或电泳迁移率的变化，检测神经发育调控蛋白 qBrn-2 蛋白及其同源蛋白。

16. 如权利要求 14 所述的一种特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 抗体的用途，其特征在于所述的研究 qBrn-2 在胚胎发育中的表达模式和发育中的调控作用的途径是石蜡切片、冰冻切片、全胚或细胞培养的免疫组织化学；研究 qBrn-2 与其靶 DNA 的相互作用及其与 qBrn-2 协同蛋白的相互作用的途径是 EMSA 。

说明书

特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 的抗体 及其制备方法和用途

本发明属于遗传工程，特别涉及特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 的抗体及其制备方法和用途。

神经系统是动物胚胎发育中最早形成的系统这一，它在动物的生长发育、再生、衰老及行为和学习等许多生命现象中起着十分重要的作用。神经发育生物学是发育生物学的一个重要分支，是目前系统动物发育基因研究的主战场。对中枢神经系统的形态发生、细胞分化和功能区域定位过程中的基因水平的调控机理的认识是分子神经发育生物学中的关键问题之一。发育基因的研究是一门跨世纪的新的综合性的边缘学科。分子神经发育生物学不仅涉及生物学和医学的基础理论研究，同时在提高我国人口素质、优生优育、减少和控制与神经系统有关的遗传疾病方面有着广泛的应用前景。发育生物学的研究至今虽不过一二十年，却已经取得相当惊人的发展。现在证明，发育基因在动物胚胎发育过程中对形态发生和器官形成起着直接调控作用。这一领域的研究成果，很可能用于以基因工程手段防治遗传疾病的技术和新的高科技药物市场。

现在已经发现一些调控蛋白分子在神经系统发育中起着关键作用。如，Hox 基因在小鼠菱脑的表达模式与其分节结构非常吻合，在菱脑每一个分节的 Hox 基因的组合决定了这一部位的特性 (Krumlauf, 1993. 遗传学趋势 (Trends Genet.) 9: 106-112.)。

POU 家族转录因子对神经系统的发育也起着非常重要的作用。如这一家族的 Tst-1/Oct-6/SCIP 主要在少树突神经胶质细胞的前体和发育中的施旺氏细胞中表达，这两种细胞分别负责中枢神经系统 and 外周神经系统覆盖髓鞘的过程。当这一基因被敲除后，中枢神经系统的髓鞘虽未受明显影响，但外周神经系统的髓鞘却受到严重损伤 (Birmingham et al 1996. 基因和发育 (Genes Dev) 10: 1751-1762; Jaegle et al 1996. 科学 (Science) 273: 507-510)。又如，Brn-2 在胚胎早期发生中的神经管广泛表达，其正常的生理功能对于下丘脑和垂体后叶的某些神经元的发育是必须的 (Nakai et al 1995. 基因和发育 (Genes Dev) 9: 3109-3121; Schonemann et al 1995. 基因和发育 (Genes Dev) 9: 3122-3135)。在人类中，某些 POU 转录因子发生突变可以引起神经系统的疾病，如与镮骨相关的耳聋就是

POU3F4 突变所致(deKok et al 1995, 科学 (Science)267: 685-688)。

到目前为止, 虽然已经从很多物种里发现了 POU 转录因子(有关综述可以参阅 Ryan et al 1997. 基因和发育 (Genes Dev) 11:1207-1225; Veenstra et al 1997. 分子生物学报告 (Molecular Biology Reports) 24: 139-155), 但是特异性识别这些转录因子的抗体却为数很少, 使对这些转录因子的功能的认识受到很大局限。例如, XLPOU 3 在早期爪蟾胚胎发生中的表达模式 (Baltzinger et al. 发育的机制 (Mech Dev) 58, 103-114), Brn-2 在大鼠中的表达模式 (Alvarez-Bolado et al. 比较神经学杂志 (The Journal of Comparative Neurology) 355, 237-295) 都是由反义核酸探针得到的结果。这些结果虽然使人们对这些基因的表达有了一定认识, 但是对另外一些重要信息却无能为力, 如这些基因的编码蛋白在动物胚胎发育中各个组织的分布及细胞内定位, 信息核酸 (mRNA) 与其编码蛋白在时间上和空间上是否一致, 编码蛋白是否存在转录后修饰。另外从方法上看, 用反义核酸探针 (anti-sense RNA probe) 操作复杂, 而且对于每种动物都要制备相应的探针。

本发明的目的是获得可以特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 的抗体, 为研究 qBrn-2 蛋白的结构与功能的关系、在胚胎发育中的表达模式及其对发育过程的调控作用提供一种特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 的抗体及其制备方法和用途。

本发明的特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 的抗体是一个以重组多肽为抗原免疫哺乳动物获得的多克隆抗体, 这一多肽为基因重组表达和纯化的 qBrn-2 的 N-末端非保守性肽段; 这一抗体对发育调控蛋白 qBrn-2 的识别位点为 qBrn-2 的 N-末端的非保守性的氨基酸序列, 该抗体不识别其它 POU 结构域蛋白; 在 Western 印记实验中, 该抗体特异地识别单一的蛋白; 利用免疫组织化学接示的 qBrn-2 表达模式与分子原位杂交的结果高度一致。例如: 在 Western 印记实验中, 该抗体特异地识别孵化三天的鹌鹑胚胎中单一的蛋白, 其表观分子量为 56,000。其二, 利用该抗体接示的 qBrn-2 表达模式于分子原位杂交的结果高度一致。

所述的重组多肽是选取 qBrn-2 的 cDNA 的 POU 盒上游区或化学合成的 cDNA, 经基因重组表达和纯化, 得到的多肽或融合多肽; 或按照 qBrn-2 的 cDNA 的 POU 盒上游区所编码的氨基酸序列化学合成的多肽或融合多肽。所述的选取 qBrn-2 的 cDNA 的 POU 盒上游区或化学合成的 cDNA 是指 qBrn-2 的 cDNA 或化学合成的-4~621 片段。所述的选取 qBrn-2 的 cDNA 或化学合成的-4~621 片段的序列及其编码氨基酸序列为:

AGTCATGGCGACCGCAGCCTCCAACCACTACAGC
M A T A A S N H Y S 10

53 CTGCTCGCCTCCGGCTCGCCCATGGTGCACGCCGAGCCGCCCGCGGCATGCAGCCCGGC 10
L L A S G S P M V H A E P P G G M Q P G 30

113 GGAGGCTACCGCGACCGGGCGCGCTGGTGCAGGCGGACTACCGCTGCAGAGCAACGGG 30
G G Y R D A G A L V Q A D Y A L Q S N G 50

173 CACCCGCTGAGCCACGCTCACCAGTGGATCGCCGCGCTGTCCCACGGCGGCCCGCGGC 50
H P L S H A H Q W I A A L S H G G P G G 70

233 GCGCGCGGAGGAGGGGGCGCGCGCGCGGAGGGGGCGCGGAGGCGCGAGGCTCCCTGG 70
G G G G G G G G G G G G G G G G E A P W 90

293 GCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGGGCCCGCCCGACATCAAGCCGGCCCGC 90
A A A A A A A A G A L G P P D I K P A A 110

353 GTGCAGGCGGCCCCCGCGCGGACGAGCTGCCGCGCCCTCCGCGAGCACCCCGCGCCCGC 110
V Q A A P R G D E L P P P P Q H P P P P 130

413 GGCCGAGCCCCGCACCTGGTGCACCACGGCGGCGGAGGCGGCGGCGCACACGCGGCGTGG 130
G R A P H L V H H G G G G G G H H A A W 150

473 CGGGCGGGCGGGCGGGCGCACCTGCCGCGGGCATGGCCGCGGCCAACGGAGCGGGCGCAG 150
R A G G A A H L P P G M A A A N G A A Q 170

533 GCGGGGCTGCTGTACCCGCGAGCCCGCGGCTTACCGTGAACGGCATGTTGGGCGCCGCG 170
A G L L Y P Q P P G F T V N G M L G A A 190

593 CAGCCCGCCTGCACCACCACGGCCTCCGCGAGCGCCACGACGAGGCTCCC 190
Q P A L H H H G L R D A H D E A P 207

所述的 qBrn-2 的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列为：

```

1          GCGAGCAGAGCGCGCGGAGTCATGGCGACCGCAGCCTCCAACCACTACAGC
                                     M A T A A S N H Y S      10
53  CTGCTCGCCTCCGGCTCGCCCATGGTGCACGCCGAGCCGCCGGCCGGCATGCAGCCCGGC
   L L A S G S P M V H A E P P G G M Q P G      30
113 GGAGGCTACCGCGACCGGGCGCGCTGGTGCAGGCGGACTACCGCTGCAGAGCAACGGG
   G G Y R D A G A L V Q A D Y A L Q S N G      50
173 CACCCGCTGAGCCACGCTCACCAGTGGATCGCCGCGCTGTCCACGGCCGCCCGGGCGGC
   H P L S H A H Q W I A A L S H G G P G G      70
233 GCGGGCGGAGGAGGGGGCGGGCGGGCGGAGGGGGCGGGAGGCGGGCAGGCTCCCTGG
   G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G E A P W      90
293 GCGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGG
   A A A A A A A A G A L G P P D I K P A A      110
353 GTGCAGGCGGCCCGCGGGCGACGAGCTGCCGCCGCTCCGCGAGCACCCGCGCGCGCG
   V Q A A P R G D E L P P P P Q H R P P P      130
413 GGCCGAGCCCGCACCTGGTGCACCACGGCGGGCGGAGGCGGGCGGGCACCACGCGCGTGG
   G R A P H L V H H G G G G G G G H H A A W      150
473 CGGGCGGGCGGGCGGGCGCACCTGCCGCCGGGCATGGCCGGGCCAACGGAGCGGGCGAG
   R A G G A A H L P P G G M A A A N G A A Q      170
533 GCGGGGCTGCTGTACCCGACGCGCCCGCTTACCCTGAACGGCATGTTGGGCGCGCGG
   A G L L Y P Q P P G F T V N G M L G A A      190
593 CAGCCCGCCCTGCACCACCACGGCTCCGCGACGCCACGAGGCTCCCGGGCGGCC
   Q P A L H H H G L R D A H D E A P G P P      210
653 GCGCCCGCCGACCACGGCGCGGACCCCGCACGGGCCGACCCCGGGCGGGAGCGGGG
   A P P H H G A E H P H G P H P A G G A G      230
713 CCGGGGGCGGGCGGAGCGGGCGGGCGGGAGGGCCGACACGAGGCGCACTCGGACGAG
   P G G G G A A A A G G P H H E A H S D E      250
773 GACACGCCGACCTCG
   D T P T S
833
893
953
1013 ACCAGCATAGACAAGATCGCGGCGCAG
      T S I D K I A A Q
1073
1133
1193
1253 GAGGACGTGTACGGGCCAGCAGGGACACGCCCGCCGCGGAGGCGGGTGCAGACCCCGTG
   E D V Y G P S R D T P P H G V Q T P V      430
1313 CAGTGACCTGGGCGCCCTCATTCCCCCCCCCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
   Q *
1373 TTCCGGCGTCTCTCTTTCAGTGTGGGGTTGCTTTTTTGTGGTTFATTTTTTCTTTGTT
1433 TTTAATTTTCTCTCTCTTTCAAAAAAAAAAAAAA

```

阴影部分为 POU 盒。

本发明特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 抗体的制备方法包括：

- (1). 选取 qBrn-2 的 POU 盒上游区或化学合成的 cDNA，构建表达质粒；
- (2). 将表达质粒导入宿主系统进行表达，经纯化获得电泳纯重组多肽；
- (3). 以这一电泳纯重组多肽为抗原，免疫哺乳动物获得特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 的抗体，命名为 anti-qBrn-2。

所述的 qBrn-2 的 POU 盒上游区是指发育调控蛋白 qBrn-2 的 1~207 个氨基酸的编码序列。所述的将表达质粒导入宿主系统进行表达是指将 pET 导入 BL21(DE3)；所述的电泳纯重组多肽的纯化是利用其 N-末端添加 His-tag，用 Ni²⁺-chelating Sepharose 4B 分离纯化。所述的 pET 是指 pET 3b 207 或 pHis 207。所述的表达质粒 pET 3b 207 的构建是用 HinfI 和 SmaI 酶切 qBrn-2 cDNA，取其位置位于-4~621 的 HinfI-SmaI 片段，用 Klenow DNA 聚合酶将末端补平，连接 12 mer 的 BamHI linker；经 BamHI 酶切后，将这一片段克隆至 pET 3b 的 BamHI 位点，形成表达质粒 pET 3b 207；所述的表达质粒 pHis 207 的构建，是用 pET 28a 的 XbaI-NdeI 片段置换 pET 3b 207 的 XbaI-NdeI 片段，形成表达质粒 pHis 207，这样就在表达质粒 pHis 207 的 N-末端添加了 His-tag 编码区。所述的重组多肽的表达是将 pET 3b 207 或 pHis 207 用 CaCl₂ 法转化 BL21(DE3) 菌株，用 LB 37°C 液体培养；当 OD₆₀₀=0.6~0.8 时，加入终浓度为 0.05~0.4mM 的 IPTG，继续培养 2~3 小时，离心收集菌体；pHis 207 所表达蛋白的纯化是用添加蛋白酶抑制剂的磷酸缓冲液悬浮菌体，其中磷酸缓冲液的 pH 7.3，aprotinin 1 μg/ml，PMSF 100 μg/ml；每 1 升培养液用 50ml 缓冲液悬浮，于冰浴中超声裂解菌体；随后，加入终浓度为 1%的 Triton X-100，轻轻搅拌均匀 30 分钟；离心取上清，其中离心条件温度为 4°C，转速为 10000 rpm，用 Ni²⁺-chelating Sepharose 4B 柱亲和吸附，用 40 mM 咪唑洗脱除去杂蛋白；然后收集 200 mM 咪唑洗脱组分，透析，冰冻干燥获得电泳纯重组多肽。所述的哺乳动物是新西兰白兔、小鼠、大鼠、荷兰猪、山羊、绵羊、马或牛。所述的免疫过程为将获得的电泳纯重组多肽作抗原，免疫 8 周龄新西兰白兔，多点皮下注射；首次免疫时，每只兔子使用的剂量为将 1.0 mg 电泳纯重组多肽，溶解在 1.0 ml 磷酸缓冲液中，添加 1.0 ml 弗氏完全作剂，充分混匀的混合物；28 天后，加强免疫，每只兔子使用的剂量为将 0.5 mg 电泳纯重组多肽，溶解在 1.0 ml 磷酸缓冲液中，添加 1.0 ml 弗氏不完全作剂，

充分混匀的混合物；两周后使用加强免疫的方法再次加强免疫；第二次加强免疫 10 天后开始取耳缘静脉血检测效价，收集适合 Western 印记实验和免疫组织化学实验的抗血清，分装，于-80℃ 冻存。

本发明特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 抗体的用途，其特征在于该抗体特异性识别神经发育调控蛋白 qBrn-2 及其同源蛋白，因此该抗体可以用于研究 qBrn-2 在胚胎发育中的表达模式和发育中的调控作用；研究 qBrn-2 与其靶 DNA 的相互作用及其与 qBrn-2 协同蛋白的相互作用。

所述的特异性识别的方式是通过酶、生物素、荧光素、生色化学基团、放射性同位素或电泳迁移率的变化，检测神经发育调控蛋白 qBrn-2 蛋白及其同源蛋白。所述的研究 qBrn-2 在胚胎发育中的表达模式和发育中的调控作用的途径是石蜡切片、冰冻切片、全胚或细胞培养的免疫组织化学；研究 qBrn-2 与其靶 DNA 的相互作用及其与 qBrn-2 协同蛋白的相互作用的途径是 EMSA (electrophoresis mobility shift assay)。

本发明的特异性识别发育调控蛋白 qBrn-2 的抗体可以在细胞水平上接示 qBrn-2 及其脊椎动物中的同源蛋白在胚胎发育中的表达模式及调控作用；研究发育调控蛋白 qBrn-2 及其脊椎动物中的同源蛋白与其靶 DNA 的相互作用，及其与协同蛋白的相互作用。在方法上，操作十分简便。

下面结合附图及实施例对本发明的技术方案作进一步的描述。

图 1、qBrn-2 cDNA 的结构；

图 2、 pET 3b 207 和 pHis 207 的结构图及重组多肽 His-P207 的纯化；

图 3、anti-qBrn-2 的特异性；

图 3A、Western blot 结果，anti-qBrn-2 识别单一的蛋白 (56,000)；

图 3B、E3 鹌鹑的分子原位杂交结果，标尺(B, C)=1 mm；

图 3C、邻片的免疫组织化学结果，标尺(B, C)=1 mm；

图 4、14 体节鹌鹑胚胎全胚的免疫组织化学结果；qBrn-2 在整个神经管、视泡、耳窝有明显表达；

图 5、anti-qBrn-2 揭示的 qBrn-2 在 E4 中的表达模式；切片是位于后肢部 E4 的横切片，qBrn-2 在神经管、生肌节、脊索中表达；NT，神经管；NC，脊索；Myo，生肌节；标尺=53 μm；

图 6、EMSA 接示的发育调控蛋白 qBrn-2 与其靶 DNA 的相互作用；

图中标示：

1. 分子量标记 2. 诱导前 3. 诱导后 4. 分子量标记 5. 诱导前

- | | | |
|-----------------|----------------|----------------|
| 6. 诱导后 | 7. 超声裂解上清液 | 8. 超声裂解沉淀 |
| 9. 过柱穿透液 | 10. 20mM 咪唑洗脱液 | 11. 40mM 咪唑洗脱液 |
| 12. 200mM 咪唑洗脱液 | 13. E3. 5 头 | 14. E3. 5 躯干 |
| 15. E5. 5 头 | 16. E5. 5 躯干 | 17. 成体脑 |
| 18. 成体肾 | 19. 实施例 7 的样 1 | |
| 20. 实施例 7 的样 2 | 21. 实施例 7 的样 3 | 22. 实施例 7 的样 4 |
| T. 端脑 | D. 间脑 | M. 中脑 |
| R. 菱脑 | F. 代表未结合的探针 | |

以下实施例所用的 qBrn-2 的 cDNA 为本实验室自主克隆 (Genbank AF091043), 表达载体为 pET 3b (Novagen), Ni⁺⁺-chelating Sepharose 4B (Pharmacia), 新西兰白兔 (301 医院), 种鹌鹑 (北京种禽公司), HRP-goat anti rabbit IgG (Vector)。

实施例 1: qBrn-2 的 cDNA 的分子克隆。

步骤 1: 筛库探针的制备:

合成如下寡核苷酸序列:

引物 1: 5' CGACCTGGAGCAGTTCGCCAA 3'

引物 2: 5' AACCAGACACGCACCACCT 3'

取孵化五天的鹌鹑胚胎, 采用 mRNA purification kit 和 cDNA synthesis kit (Pharmacia Biotech), Inc), 按照产品说明书提供的方法, 制备 cDNA。利用引物 1 和引物 2, 进行 PCR 实验, 使用 Taq DNA 聚合酶。97°C 保温 10 分钟后, 进入如下循环, 55°C 退火 1 分钟, 72°C 延伸 2 分钟, 94°C 变性 1 分钟, 循环 35 次, 得到筛库 DNA 片段, 序列为:

```

1  CGACCTGGAGCAGTTCGCCAAGCAGTTCAAGCAACGACGCATCAAGCTGGGCTTCAOCCA
61  GGCCGAOCTGGGACTGGCGCTGGGCAOCCCTCTACGGTAAOCTGTTCTCGCAGACCACCAT
121 CTGCOGTTTCGAGGCCOCTGCAGCTGAGCTTCAAGAACATGTGCAAGCTCAAGCOGCTGCT
181 CAACAAGTGGCTGGAGGAGACCGACTCGTCCAGCGGCAGCCCCACCAACCTGGACAAGAT
241 CGCGGCGCAGGGCCGCAAGCGCAAGAAGCGCACGTCCATCGAGGTGGGTGTCAAAGGCGC
301 GCTCGGCCGTCTGCAGAGCCACTTTCTCAAGTGTCCCAAGCAGGAGATCACCGGCCTGGC
361 CGACAGCCTGCAACTGGAGAAGGAGGTGGTGGTGTCTGGTT

```

采用随机引物标记法, 将该 DNA 片段进行 ³²P 标记, 制备成为筛库探针。

步骤 2: 孵化五天的鹌鹑的全胚胎 cDNA 文库的构建。

取孵化五天的鹌鹑胚胎, 按步骤 1 的方法制备 cDNA, 末端连接 EcoRI adaptor, 然后克隆至 pBluescript SK 载体中, 转化 DH5 α 菌株感受态细胞, 构建成孵化五天的鹌鹑的全胚胎 cDNA 文库。扩增前该文库为 3x10⁵ 个克隆。

步骤 3: 用步骤 1 制备的探针对步骤 2 制备的文库进行筛选, 采用常规方法 (分子克隆, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989),

得到发育调控蛋白 qBrn-2 的 cDNA 克隆，其序列如说明书中所示。

实施例 2: 表达质粒的构建。用 HinfI 和 SmaI 酶切 qBrn-2 cDNA (图 1)，取 HinfI-SmaI (-4~621) 片段，用 Klenow DNA 聚合酶将末端补平，连接 BamHI linker (12 mer)。经 BamHI 酶切后，将这一片段克隆至 pET 3b 的 BamHI 位点，形成 pET 3b 207。为便于后期纯化这一重组多肽，用 pET 28a 的 XbaI-NdeI (His-tag 编码区) 片段置换 pET 3b 207 的 XbaI-NdeI 片段，形成 pHis 207 (图 2)。酶切图谱和 DNA 测序结果表明表达质粒的构建准确无误。

实施例 3: 重组多肽的表达和纯化。将 pHis 207 转化 BL21(DE3) 菌株，用 LB 37°C 液体培养。当 OD₆₀₀=0.6 时，加入 IPTG (终浓度 0.4mM)，继续培养 3 小时，离心收集菌体。用添加蛋白酶抑制剂的磷酸缓冲液 (pH 7.3, aprotinin 1 μg/ml, PMSF 100 μg/ml) 悬浮菌体，每 1 升培养液用 50ml 缓冲液悬浮，于冰浴中超声裂解菌体。随后，加入 Triton X-100 (终浓度 1%)，轻轻搅拌均匀 30 分钟。离心取上清 (4°C, 10000 rpm)，用 Ni²⁺-chelating Sepharose 4B 柱亲和吸附，用 40mM 咪唑洗脱除去杂蛋白。然后收集 200mM 咪唑洗脱组分，透析，冰冻干燥，得到电泳纯重组多肽 (图 2)。

实施例 4: 抗血清 anti-qBrn-2 的制备。取实施例 2 中获得的电泳纯重组多肽作抗原，免疫 8 周龄新西兰白兔，多点皮下注射；首次免疫时，每只兔子使用的剂量为将 1.0 mg 电泳纯重组多肽，溶解在 1.0 ml 磷酸缓冲液中，添加 1.0 ml 弗氏完全作剂，充分混匀的混合物；28 天后，加强免疫，每只兔子使用的剂量为将 0.5 mg 电泳纯重组多肽，溶解在 1.0 ml 磷酸缓冲液中，添加 1.0 ml 弗氏不完全作剂，充分混匀的混合物；两周后使用加强免疫的方法再次加强免疫；第二次加强免疫 10 天后开始取耳缘静脉血检测效价，收集适合 Western 印记实验和免疫组织化学实验的抗血清，分装，于 -80°C 冻存

实施例 5: 抗血清的特异性。anti-qBrn-2 具有良好的特异性，这由以下结果证明。其一，Western 印记实验。取孵化 3.5 天，5.5 天鹌鹑胚胎的头部及躯干，成体鹌鹑脑、肾组织，加相当于组织体积 1~2 倍的悬浮缓冲液 (0.1 M NaCl, 0.01 M Tris-Cl (pH7.6), 0.001 M EDTA (pH8.0), 1 μg/ml aprotinin, 100 μg/ml PMSF)，将组织剪碎，然后迅速加入 0.5 体积的 3 倍的 SDS-PAGE 上样缓冲液 (150 mM Tris-Cl (pH6.8), 300 mM DTT, 6% SDS, 0.3% 溴酚蓝, 30% 甘油)，水浴煮 10 分钟。离心 (14000 rpm, 4°C) 取上清，确定各个上清液的蛋白浓度，方法如下。各取 1 μl 上清液，加入 200 μl 双蒸水中。同时分别取 5, 10, 15, 20, 25 μg 牛血清白蛋白，加双蒸水至 200 μl。在每管中依次加入 20 μl 0.15% 脱氧胆酸钠和 20 μl 72% 三氯乙酸，离心 (3000g)，取沉淀，然后用 Lorry 法测蛋

白浓度。在免疫印记实验时，各取 70 μg 蛋白，进行 SDS-PAGE (12%)。电泳，然后电转移至硝酸纤维素膜上。随后，用溶液(PBS+0.2% Tween 20+5% skim milk+5% 山羊血清)孵浴此膜以封闭非特异性位点，然后用一抗溶液(PBS+0.2% Tween 20+5% skim milk +5% 山羊血清+1:800 anti-qBrn-2)孵浴此膜，再用溶液(PBS+0.2% Tween 20+5% skim milk+5% 山羊血清)充分漂洗以除去过剩的一抗，接下来用二抗溶液(PBS+0.2% Tween 20+5% skim milk+5% 山羊血清+HRP-goat anti rabbit IgG, 1:20,000, Vector)特异性识别一抗，最后用 ECL 试剂(Dupont)浸润，X-片曝光，标记位置。结果表明，anti-qBrn-2 可以特异地识别单一的蛋白(图 3A)，说明它具有良好的特异性。其二，免疫组织化学与分子原位杂交结果的高度一致。取孵化 3 天鹌鹑的纵切片，分别做免疫组织化学和分子原位杂交，方法参照以往报道(Xue 1993. 发育机制 (Mech Dev) 43: 149-158)。结果发现，二者揭示的表达模式高度吻合，qBrn-2 在脑部和脊髓的神经管中广泛表达(图 3B, C)，说明这一抗体所识别的蛋白正是 qBrn-2。实验中的免疫组织化学的方法具体为，取石蜡切片，脱腊加水，用封闭液(PBS+0.15%Tween 20+3% 脱脂牛奶+5% 山羊血清)除去非特异性结合位点，然后将 anti-qBrn-2 (1:200) 溶于封闭液中 4°C 孵育切片过夜。接下来用封闭液洗去未结合的一抗，将二抗(1:2000, goat anti rabbit IgG, Vector)溶于封闭液中孵育切片室温 2 小时，最后用 PBS 洗去多余二抗，DAB 显色，镜检。

实施例 6: anti-qBrn-2 适用于全胚的免疫组织化学。取孵化一至两天的鹌鹑胚胎(具体发育期按体节数判定)，用 PBS 缓冲液清洗三次，然后用 4%的多聚甲醛固定 2 小时。随后用 PBS 缓冲液清洗胚胎除去剩余的多聚甲醛，用 3% H_2O_2 于摇床上孵浴 2 小时。接下来用溶液 PBS-A (PBS+0.2% TritonX-100+ 2% skim milk+ 5% 山羊血清)于摇床上孵浴 1.5 小时以除去非特异性结合位点。随后用 anti-qBrn-2 溶液 (PBS-A+anti-qBrn-2, 1:200) 4°C 孵浴过夜。次日，用 PBS-A 充分漂洗以除去未结合的抗体。随后用二抗溶液 (PBS-A+山羊抗兔 IgG, 1: 2000) 孵浴 2 小时。最后用 PBS 充分漂洗，DAB 显色 (300 $\mu\text{l/ml}$ DAB, 0.03% H_2O_2)。图 4 是一个 14 体节的胚胎全胚免疫组织化学结果，可以看到 qBrn-2 在神经管、视泡、耳窝有明显表达(图 4)。

实施例 7: anti-qBrn-2 适用于切片上免疫组织化学。取孵化 4 天的鹌鹑胚胎，用 4%多聚甲醛固定，制备石蜡切片(7 μm)，按实施例 4 中的免疫组化方法操作，结果显示 qBrn-2 在神经管、生肌节、脊索有明显表达(图 5)，在高倍镜下可以看到免疫标记位置位于神经上皮细胞的胞核内，与其作为转录因子的功能非常吻合，这些结果提示 qBrn-2 在这些部位的发育中起重要的作用。

实施例 8: anti-qBrn-2 适用于研究 qBrn-2 DNA 相互作用。

步骤 1: 细胞全蛋白的提取。

取孵化 3.5 天的鹌鹑胚胎 3 只, 用 PBS 缓冲液清洗, 加 0.5ml 缓冲液匀浆 (5mM Hepes (pH7.9), 26% glycerol (v/v), 1.5mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF)。此时测量组织悬浮液体积, 加 NaCl 至 300mM, 混匀, 冰浴 30 分钟。随后离心取上清液 (24000g, 分钟, 4°C), 分装, 于干冰/乙醇中速冻后, -70°C 存。上述全细胞提取液的蛋白浓度由 Lorry 法测定。

步骤 2: 探针的制备。

合成如下 DNA 序列:

a: 5' AGCT TGCAT AAATA ATAGG C 3'

b: 5' TCGA GCCTA TTATT TATGC A 3'

将上述序列 a 和序列 b 用双蒸水溶解, 按等摩尔混匀, 终浓度为 2 pmol/μl。将此溶液于 80°C 水浴 5 分钟, 随后缓慢冷却至室温, 取 2 pmol 进行 32-P 标记, 采用 Klenow 聚合酶末端补平法, 用 Sephadex G-50 除去游离的 dNTP。此时将体积调至 200μl。

步骤 3: 蛋白与 DNA 的结合。

按下表配制:

表 1: 蛋白与 DNA 的结合

	缓冲液*	KCl 终浓度	poly (dIdC)	蛋白 提取液	anti-qBrn- 2 1:10	免疫前血 清 1:10
样 1	至 20μl	50 mM	2μg	15μg	0	0
样 2	至 20μl	50 mM	2μg	15μg	0	0
样 3	至 20μl	50 mM	2μg	15μg	1μl	0
样 4	至 20μl	50 mM	2μg	0	0	1μl

缓冲液*: 20mM Hepes (pH7.9), 1mM MgCl₂, 4% Ficoll, 0.5mM DTT。

接下来, 冰浴 30 分钟。随后, 在样 1, 2, 3, 4 中各加入探针 1μl。然后, 再冰浴 40 分钟。最后, 电泳 4% PAGE, 0.25xTBE, 放射自显影。

结果发现, 加入 anti-qBrn-2 后, 其中一条带且仅有一条带消失 (图 6, 尖头所指位置), 说明这条带是 qBrn-2 与探针结合产生的。

说明书附图

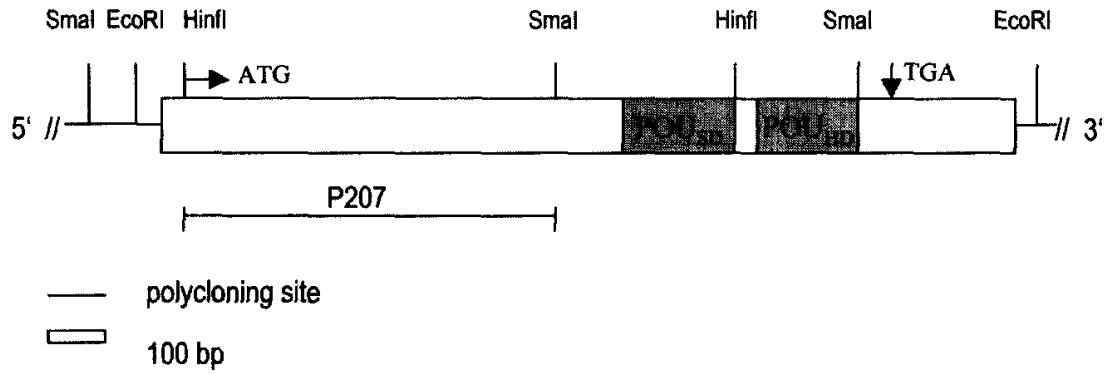


图1

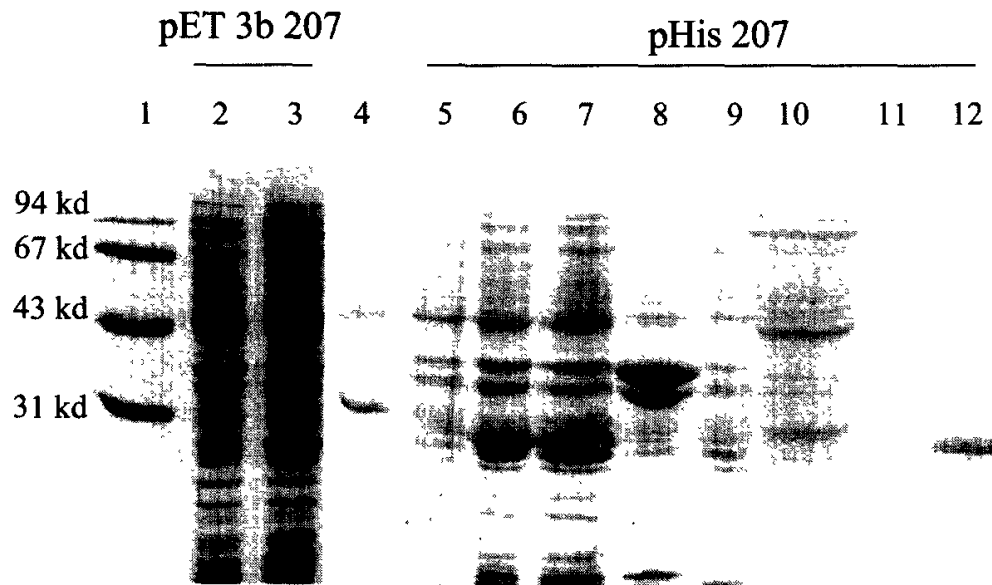
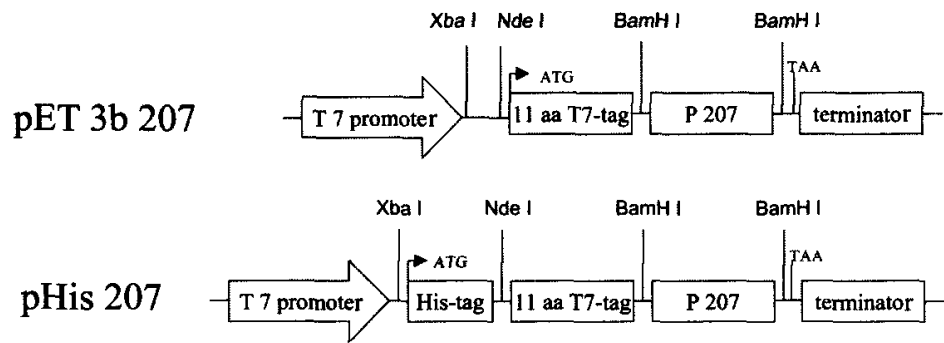


图2

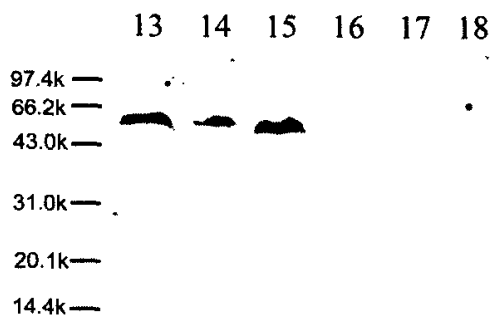


图3A

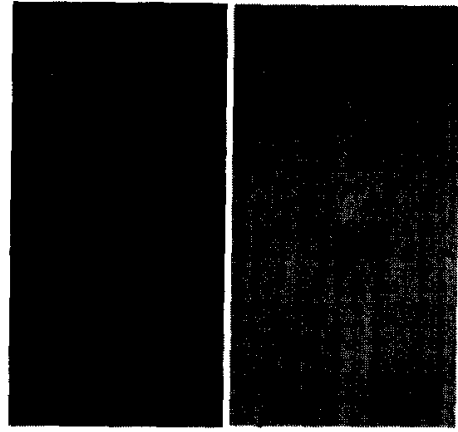


图3B

图3C



图4



图5

19 20 21 22



F

图6