

[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 200610000263.8

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月18日

[11] 公开号 CN 100999760A

[22] 申请日 2006.1.10

[21] 申请号 200610000263.8

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路15号

[72] 发明人 张先恩 李永进 毕利军 周亚凤
张吉斌 陈媛媛 李 炜 张治平

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 程金山

权利要求书2页 说明书16页 附图6页

[54] 发明名称

链霉亲和素包被芯片表面的配基的可逆固定

[57] 摘要

针对于 BIAcore 生物传感器中链霉亲和素包被的芯片表面(SA - 芯片), 本技术公开了一种新的配基固定模式。传统的用于 SA - 芯片的配基是利用了生物素与链霉亲和素之间的特异的相互作用, 由于两者之间非常强的作用力, 使得 SA - 芯片成为一次性的商品。本方法利用链霉亲和素与其亲和标签(SBP - 标签, Nano - 标签)之间的特异的相互作用, 通过将亲和标签与目的配基的融合, 可以实现目的配基的定向固定, 在温和可控的条件下, 芯片的表面可以再生, 实现了 SA - 芯片的重复利用。这种新的配基固定方法, 可以实现配基在 SA - 芯片表面的可逆的定向固定, 极大的降低了实验成本, 具有很好的应用价值。

1. 一种实现配基在 SA-芯片表面上的可逆固定的方法，该方法包含：
 - (1) 选择 SBP-标签或 Nano-标签作为融合标签；
 - 5 (2) 利用基因融合技术将配基与 SBP-标签或 Nano-标签融合；
 - (3) 利用 SBP-标签或 Nano-标签与 SA-芯片之间的相互作用，将上述带有标签的配基固定在 SA-芯片上；
 - (4) 在需要再生时，根据配基与融合标签的组合类型，选择适当的再生条件将上述带有标签的配基从 SA-芯片上洗脱下来。
- 10 2. 根据权利要求 1 的方法，其中所述 SBP-标签的序列为 MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP。
3. 根据权利要求 1 的方法，其中所述 Nano-标签的序列为 DVEAWLGAR 或 DVEAWLGARVPLVET。
4. 根据权利要求 1-3 中任何一项的方法，其中所述洗脱条件通常为
15 0-50 mM NaOH，流速为 30-40 $\mu\text{l}/\text{min}$ ，注射时间 1 min，注射次数随融合标签类型而不同。
5. 根据权利要求 1 的方法，其中所述配基可以另外与其配体结合。
6. 一种可实现配基在 SA-芯片表面上的可逆固定的 SA-芯片检测系统，该系统包括：
 - 20 (1) SA-芯片；
 - (2) 带有 SBP-标签或 Nano-标签的配基，其中利用基因融合技术将配基与 SBP-标签或 Nano-标签融合，
其中带有 SBP-标签或 Nano-标签的配基可以利用 SBP-标签或 Nano-标签与 SA-芯片之间的相互作用被固定在 SA-芯片上，在需要再生时，
25 根据配基与融合标签的组合类型，选择适当的再生条件将上述带有标签的配基从 SA-芯片上洗脱下来。
7. 根据权利要求 6 的系统，其中所述 SBP-标签的序列为 MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP。
8. 根据权利要求 6 的系统，其中所述 Nano-标签的序列为
30 DVEAWLGAR 或 DVEAWLGARVPLVET。

9. 根据权利要求 6-8 中任何一项的系统, 其中所述洗脱条件通常为 0-50 mM NaOH, 流速为 30-40 $\mu\text{l}/\text{min}$, 注射时间 1 min, 注射次数随融合标签类型而不同。

10. 根据权利要求 6 的方法, 其中所述配基可以另外与其配体结合。

链霉亲和素包被芯片表面的配基的可逆固定

5 技术领域

本技术涉及了生物传感器及生物技术领域，更具体地，本发明涉及一种实现配基在 SA-芯片表面上的可逆固定的方法，和一种可实现配基在 SA-芯片表面上的可逆固定的 SA-芯片检测系统。

10 背景技术

BIAcore 生物传感器系统是由安马西亚公司提供的专门用于生物分子相互作用分析的仪器，该系统主要由光学检测系统、样品传送系统、输出系统三部分组成，见图 1。BIAcore 系统提供了各种类型的芯片用于不同配基的固定。羧甲基葡聚糖包被的芯片（CM 芯片）是最通用的一种芯片，适用于大多数的蛋白，但由于是利用蛋白表面的氨基进行固定，因而形成一种异质的表面，一些配基在固定后会丧失生物活性。在 BIAcore 生物传感器中，配基在芯片表面定向固定对于保持其生物活性以及形成一个均质的表面是至关重要的。基于此，BIAcore 系统提供了 NTA（nitrilotriacetic acid）修饰的芯片，用于固定融合了 his-标签的配基分子，但由于 his-标签本身的疏水性，有时会包埋于目的配基分子内从而会影响其固定。在 CM 芯片表面衍生了蛋白 A 的芯片可以用于抗体的定向固定，但并不适用于其它的蛋白分子。迄今为止，BIAcore 系统配备的 SA-芯片（Streptavidin-chip，链霉亲和素包被的芯片）对于生物素化的配基的固定是最好的选择。SA-芯片是在 CM 芯片的基础上在其表面又修饰了链霉亲和素，见图 2。但由于 SA 与生物素之间强的相互作用力使得 SA-芯片成为一次性的商品，对于需要研究不同配基性质以及经常需要变换配基固定量的应用实验成本极其昂贵。

发明内容

30 SBP-标签和 Nano-标签是链霉亲和素的两种亲和标签（SBP-标签

(tag): MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP ;
Nano- 标签 有 两 种 , Nato- 标签 ₉: DVEAWLGAR ; Nano- 标签 ₁₅:
DVEAWLGARVPLVET) 。 构 建 SBP- 标 签 和 Nano- 标 签 融 合 蛋 白 的 具 体
方 法 可 参 见 文 献 [1, 2] 。 这 两 种 亲 和 标 签 与 链 霉 亲 和 素 的 平 衡 解 离 常 数 都 在
5 纳 摩 尔 级 , 在 温 和 的 可 控 制 的 条 件 下 , 可 以 从 链 霉 亲 和 素 修 饰 的 表 面 解 离 。
基 于 此 , 我 们 利 用 基 因 融 合 技 术 将 SBP- 标 签 或 Nano- 标 签 与 目 的 配 基 进 行
融 合 , 替 代 了 传 统 的 配 基 的 生 物 素 化 过 程 , 从 而 实 现 了 配 基 在 SA- 芯 片 表
面 的 可 逆 的 定 向 固 定 (见 图 8) 。

因 此 , 本 发 明 的 一 个 目 的 是 提 供 一 种 实 现 配 基 在 SA- 芯 片 表 面 上 的 可
10 逆 固 定 的 方 法 , 该 方 法 包 含 :

- (1) 选 择 SBP- 标 签 或 Nano- 标 签 作 为 融 合 标 签 ;
- (2) 利 用 基 因 融 合 技 术 将 配 基 与 SBP- 标 签 或 Nano- 标 签 融 合 ;
- (3) 利 用 SBP- 标 签 或 Nano- 标 签 与 SA- 芯 片 之 间 的 相 互 作 用 , 将 上 述
带 有 标 签 的 配 基 固 定 在 SA- 芯 片 上 ;
- 15 (4) 在 需 要 再 生 时 , 根 据 配 基 与 融 合 标 签 的 组 合 类 型 , 选 择 适 当 的 再
生 条 件 将 上 述 带 有 标 签 的 配 基 从 SA- 芯 片 上 洗 脱 下 来 。

在 本 发 明 的 一 个 实 施 方 案 中 , 其 中 所 述 SBP- 标 签 的 序 列 为
MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP 。

在 本 发 明 的 另 一 个 实 施 方 案 中 , 其 中 所 述 Nano- 标 签 的 序 列 为
20 DVEAWLGAR 或 DVEAWLGARVPLVET 。

在 本 发 明 的 另 一 个 优 选 实 施 方 案 中 , 其 中 所 述 洗 脱 条 件 通 常 为 0-50
mM NaOH , 流 速 为 30-40 μ l/min , 注 射 时 间 1 min , 注 射 次 数 随 融 合 标 签
类 型 而 不 同 。 另 外 , 所 述 配 基 可 以 另 外 与 其 配 体 结 合 。

本 发 明 还 提 供 一 种 可 实 现 配 基 在 SA- 芯 片 表 面 上 的 可 逆 固 定 的 SA- 芯
25 片 检 测 系 统 , 该 系 统 包 括 :

- (1) SA- 芯 片 ;
- (2) 带 有 SBP- 标 签 或 Nano- 标 签 的 配 基 , 其 中 利 用 基 因 融 合 技 术 将
配 基 与 SBP- 标 签 或 Nano- 标 签 融 合 ,

其 中 带 有 SBP- 标 签 或 Nano- 标 签 的 配 基 可 以 利 用 SBP- 标 签 或 Nano-
30 标 签 与 SA- 芯 片 之 间 的 相 互 作 用 被 固 定 在 SA- 芯 片 上 , 在 需 要 再 生 时 , 根

据配基与融合标签的组合类型，选择适当的再生条件将上述带有标签的配基从 SA-芯片上洗脱下来。

在本发明的一个实施方案中，其中所述 SBP-标签的序列为 MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP。

5 在本发明的另一个实施方案中，其中所述 Nano-标签的序列为 DVEAWLGAR 或 DVEAWLGARVPLVET。

在本发明的另一个优选实施方案中，其中所述洗脱条件通常为 0-50 mM NaOH，流速为 30-40 $\mu\text{l}/\text{min}$ ，注射时间 1 min，注射次数随融合标签类型而不同。另外，所述配基可以另外与其配体结合。

10 本方法利用基因融合技术在目的配基的 N 端或 C 端融合链霉亲和素的亲和标签，根据选择的亲和标签类型选择适当的再生条件来实现 SA-芯片表面的再生。主要步骤如下：

- 1) 选择 SBP-标签或 Nano-标签作为融合标签与目的配基通过基因融合技术融合
- 15 2) 根据选择的融合标签类型以及配基分子自身的性质选择不同的再生条件，通常可选用 0-50 mM NaOH

在步骤 2) 中，由于配基分子与融合的标签之间的相互影响，再生条件可能会不一致，可根据不同组合情况优化再生条件。

20 本技术与现有技术相比，具有以下优点：本技术中使用的链霉亲和素亲和标签可以通过基因融合技术很容易的引入配基分子；融合的亲和标签一般不会干扰配基分子的生物活性；利用亲和标签与链霉亲和素的特异作用，可以实现配基分子的定向固定，形成均质的芯片表面；利用亲和标签，可以实现配基分子的可逆固定，使芯片表面可以重复使用。

25 附图说明

下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步的详细描述，但不应理解为是对本发明进行限定。

图 1. BIAcore 生物传感器系统 (a: 光学检测系统; b: 样品传送系统; c: 输出系统);

30 图 2. SA-芯片示意图 (左) 和表面修饰示意图 (右);

图 3. ScFv-Z186-SBP 在 SA 芯片表面的最大结合量 (a) 35 μ l 的注射量导致了大约 2700 RU 响应; (b)和(c) 两次连续的 30 μ l 的注射(5 μ l/min, 6 min) 使响应值从 3110 RU 到 3300 RU; (d) 最后 10 μ l 的注射响应值没有明显的升高, 表明芯片表面基本已达到饱和。

5 图 4. scFv-Z186-SBP 的固定及芯片表面的再生 (a), (b) 和 (c): scFv-Z186-SBP 固定实验的三次重复, 响应值分别是 636.6 RU, 658 RU 和 655.6 RU; (d), (e)和(f): 固定的 scFv-Z186-SBP 三次再生过程, 每次再生用 50 mM NaOH (30 μ l/min, 1 min)连续注射两次, 再生后基线没有显著改变。

10 图 5. nano-标签修饰短肽的最大结合量 (a)–(f)响应值分别为 30 RU, 50.2 RU, 94 RU, 112 RU, 130 RU 和 136 RU。(g)为再生过程(50 mM NaOH, 30 μ l/min, 1 min)。

图 6. nano-标签修饰短肽的固定及芯片表面的再生过程 (a), (b)和(c)为三次重复的固定过程, 响应值分别为 53.3 RU, 57.7 RU 和 56.5 RU。(d), 15 (e)和(f)为三次重复的再生过程, 每次再生用 50 mM 氢氧化钠(30 μ l/min, 1 min)。

图 7. scFv-Z186-SBP 修饰的芯片表面与其抗原的动力学曲线, 抗原的浓度范围从上到下依次为 1430, 715, 358, 179, 90 和 0 nM。

20 图 8. SA-芯片与带 SBP-tag 或 Nano-tag 的配基的结合示意图 (a) 和 SA-芯片与生物素化配基的结合示意图 (b), 所述配基可以任选地与其配体 (如抗原或抗体结合)。

图 9. 质粒 pOPE-Z186-SBP 的示意图。

图 10. 单链抗体 scFv 噬菌体展示载体 pCANTAB5E-scFv 的示意图。

25 具体实施方式

材料

以下实验中所用 nano-标签修饰的短肽 (DVEAWLGARFLDEV, 其中下划线部分是短肽序列) 由上海吉尔生化有限公司合成。SA 芯片购于安马西有限公司 (瑞典)。SBP-标签修饰的单链抗体及其相应抗原由本实

30

实验室构建，构建过程见下文。pOPE101-215(Yol)为中国疾病预防控制中心梁米芳老师赠送，pCANTAB5E 及 M13K07 辅助噬菌体为 Pharmacia 公司产品，pCANTAB5E-Z186 为本室构建。pET32a (+)质粒载体为本室保存。大肠杆菌 TG1 为本室保存。菌种 *E.coli* XLBlue、*E.coli* AD494 (DE3)均为本室保存。Tris、NaOH、NaCl、TWEEN 20 均为 Sigma 公司（美国）产品。其他化学试剂均系分析纯试剂，实验中所用水均为 Millipore 超纯水。所有实验用缓冲液均需 0.22 μ m 滤膜过滤及进行除气处理。所有实验在室温（25℃）进行。

10 方法

1 ScFV-Z186-SBP 表达载体的构建

ScFV-Z186-SBP（抗牛肮病毒单链抗体 Z186）全基因序列如下：ATG
 GCC CAG GTG AGC TGC AGC AGT CTG GGG CTG AAC TGG CAA
 GAC CTG GGG CCT CAG GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC
 15 TAC ACC TTT ACT AGC TAC ACG ATG CAC TGG GTA AAA CAG AGG
 CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC ATT AAT CCT AGC
 AGT GGT TAT ACT AAT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC AAG GCC
 ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA
 CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT
 20 GCA AGA GAA GGG GAT TAC TAC GGT AGT AGT GGG GCT TAC TGG
 GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT
 TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGA GGA TCG GAC ATT GAG
 CTC ACC CAG TCT CCA ACA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG
 AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC
 25 ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA
 TGG ATT TAT GAC ACA TCC AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT
 CGC TTC AGT GGC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGC ATG GAG
 GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG AGT GGG TCT GGG
 ACC CAG TGG AGT AGT AAC CCA CCC ACG TTC GGC TCG GGG ACA
 30 AAG TTG GAA ATA AAA CGG ATG GAC GAG AAG ACC ACT GGT TGG

CGA GGT GGA CAC GTT GTT GAA GGA CTG GCT GGG GAA CTT GAA
CAA CTT CGT GCA CGA CTG GAG CAT CAC CCA CAA GGT CAA CGT
GAA CCA (下划线部分是编码 SBP 肽的序列), 该单链抗体为本室构建,
其序列为测序结果, 利用 *Nco*I 和 *Not*I 双酶切 pCANTAB5E-Z186
5 (pCANTAB5E-Z186 构建的过程见后), 与同样双酶切的载体
pOPE101-215(Yol) (pOPE101-215(Yol)为中国疾病预防控制中心梁米芳老师赠
送, pOPE101-215(Yol)的参考文献见 Schmi edl, A., Breitling, F., Du" bel, S.,
2000. Expression of a bispecific dsFv-dsFvV antibody fragment in E. Coli.
Protein Eng. 13, 725.) 以 3: 1 的摩尔比连接, 经 T4 DNA 连接酶于 16C°
10 条件下连接过夜, 连接产物为 pOPE-Z186。利用上游引物
5'ATATAGCGGCCGCTTCGAGCTCAGGAG 3' 和下游引物
5'TGACCGGATCCTGGTTCACGTTGACCTT3'扩增 SBP 片段 (模板质粒
是 pTAG2K (Keefe, A. D.; Wilson, D. S.; Seelig, B.; Szostak, J. W. One-step
purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity
15 streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag. *Protein Expr. Purif.* 2001, 23 (3),
440-6.), 双链两端分别为 *Not*I 和 *Bam*HI 限制性酶切位点。然后双链序列
与经 *Not*I 和 *Bam*HI 双酶切的线性化质粒 pOPE-Z186 片段混合, 经 T4
DNA 连接酶于 16C°下连接过夜, 连接产物为载体 pOPE-Z186-SBP。如图
9。

20

2 ScFV-Z186-SBP 的表达及纯化

将上述连接产物 pOPE-Z186-SBP 采用钙转化法转化 *E.coli* XL Blue,
用终浓度为 1mM 的 IPTG 诱导。利用融合蛋白末端的 His₆-tag 标签, 利用
固定化金属离子 (Ni²⁺) 配体亲和层析柱纯化目的蛋白 scFv。

25

3 ScFV-Z186-SBP 抗原基因表达载体的构建

以上游引物 (5'-GGGAGATCTGAAGAAGCGACCAAAACCTG- 3')
和下游引物 (5'-GAGGAATTCACCTTGCCCCTCGTTGGTAATA- 3') 扩增
抗原基因 (抗原基因的 GenBank 号: AJ298878, 自己克隆的基因和 GenBank
30 上的牛胚蛋白基因进行同源比较就可知是抗原基因, Hills, D., Comincini, S.,

Schlaepfer,J., Dolf,G., Ferretti,L. and Williams,J.L. Complete genomic sequence of the bovine prion gene (PRNP) and polymorphism in its promoter region. *Anim. Genet.* 32 (4), 231-232 (2001)), 抗原基因的模板是提取的牛基因组, 在上游引物和下游引物的 5'端分别加有一个 *Bgl* II 和 *ECoR* I 酶切位点。扩增的基因用 *Bgl* II 和 *ECoR* I 酶切, 与用同样酶切的线性化质粒载体 pET32a (+)混合, 经 T4 DNA 连接酶于 16C°下连接过夜, 连接产物为抗原的基因表达载体。PCR 反应条件如下:

	10×Taq Plus 反应缓冲液 A	5 μL
	dNTP (2.5 mM)	1 μL
10	Reverse Primer (150 μg/mL)	1 μL
	基因组 DNA	5 μL
	Taq Plus I DNA 聚合酶	0.5 μL
	加 ddH ₂ O 至总体积	50 μL

PCR 反应条件为: 94C° 1 分钟, 55 C° 1 分钟, 72 C° 1 分钟, 30 个循环, 72 C° 延伸 5 分钟。

3 牛总 DNA 的提取

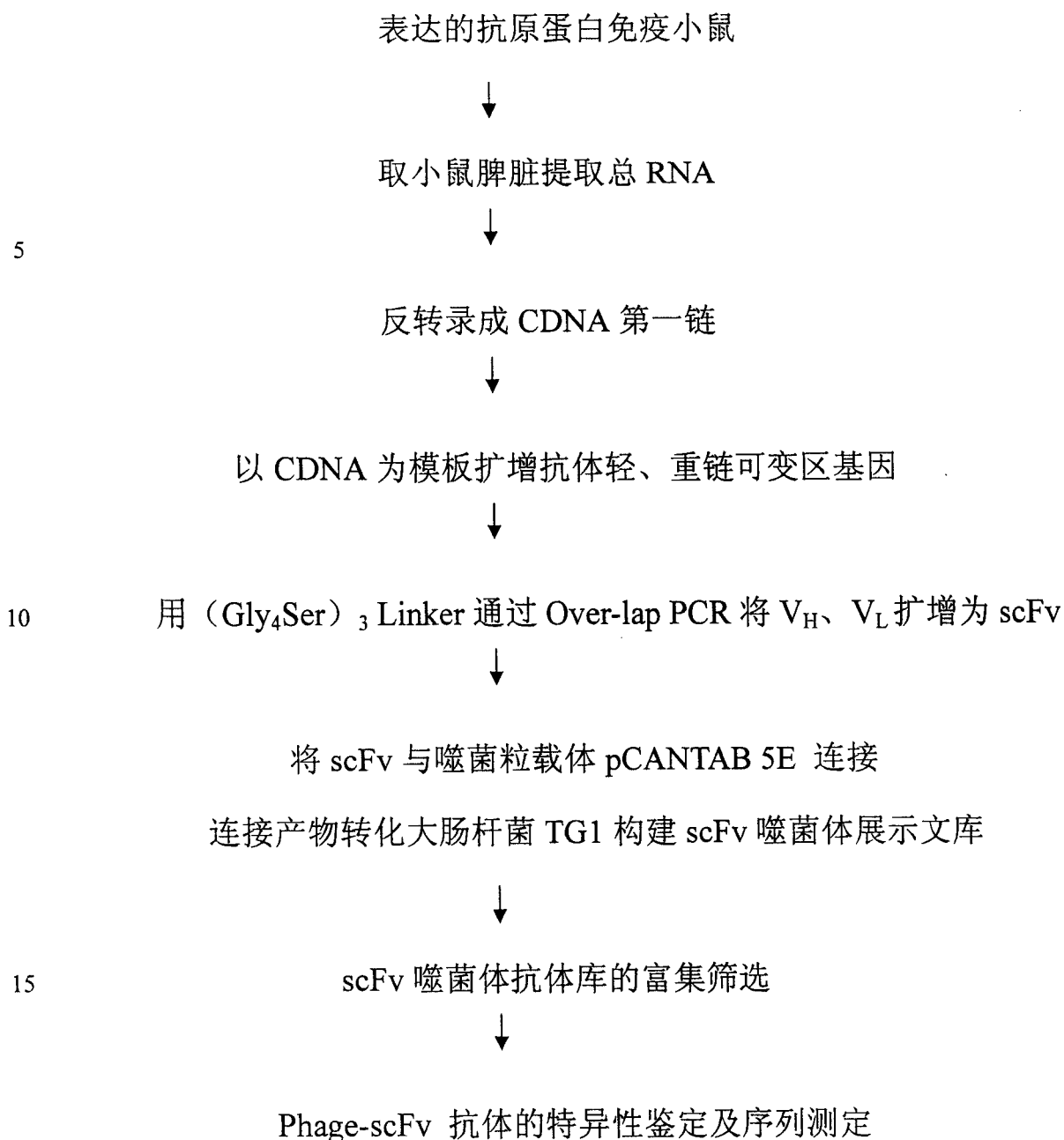
实验所用牛血液标本取自湖北省畜牧兽医研究所。取新鲜的牛血 20 mL, 低速离心分离白细胞, 按体积比 1: 2 加入消化缓冲液 (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH8.0), 0.5% SDS) 重悬细胞, 55°C 消化用平衡酚抽提两次, 再用等体积的氯仿抽提两次, 加入倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 用 70%乙醇洗沉淀, 真空抽干, 加 TE 溶解。

4 ScFV-Z186-SBP 抗原的表达纯化

构建的抗原基因表达载体钙转化法转化 *E.coli* AD494 (DE3), 用终浓度为 1 mM 的 IPTG 诱导。利用融合蛋白末端的 His₆-tag 标签, 利用固定化金属离子 (Ni²⁺) 配体亲和层析柱纯化。

5 pCANTAB5E-Z186 的构建

pCANTAB5E-Z186 的构建程序大致如下：



用纯化的抗原采用腹部和背部皮下多点注射方法进行免疫，每隔 21
20 天免疫 1 次。解剖免疫的小鼠，取脾脏放入不含 RNA 酶的玻璃匀浆器中，
加入 1 mL Trizol 放在冰上研磨混匀，移入不含 RNA 酶 1.5 mL Eppendorf
管中。加入氯仿(每 1 mL Trizol 加 200 μ L 氯仿)振荡混匀，4 C° 12000 r/min
离心 15 min，将上清转移到新的不含 RNA 酶的 1.5 mL Eppendorf 管内，
加入异丙醇(每 1 mL Trizol 加 500 μ L 异丙醇，上下颠倒混匀，静置 10 min，

4 C°12000 r/min 离心 10 min 弃上清。用 80%冰乙醇洗沉淀, 4 C°12000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 将 Eppendor 口朝下倾斜放在无菌吸水纸上, 室温静置 15-20 min。加入 DEPC 处理水 50 μ L 溶解 RNA, -20 C°保存, 用于 cDNA 第一链合成。cDNA 第一链合成的条件如下:

5	总 RNA	10 μ L
	Oligo-(dT)15 primer	1 μ L
	10 \times PCR Buffer	2 μ L
	0.1 %BSA	2 μ L
	40 u/ μ L RNase inhibitor	0.5 μ L
10	5 u/ μ L AMV 反转录酶	1 μ L
	补水到终体积	20 μ L

混匀, 42 C° 温育 1 h, 反应产物即为 cDNA 第一链, 取出至 -20 C° 保存备用。

用 cDNA 第一链为模板扩增抗体轻、重链可变区基因, 条件如下: 轻、重链基因的扩增 (50 μ L):

	10 \times PCR Buffer	5 μ L
	10 mM dNTP	1 μ L
	cDNA 第一链产物	5 μ L
	轻或重链基因引物	1 μ L
20	Taq DNA 聚合酶	1 μ L
	补水至终体积	50 μ L

94 C° 5 min, 94 C° 30 s, 57 C° 30 s, 72 C° 30 s, 30 循环, 72 C° 延伸 10 min。

将抗体轻、重链可变区基因组装为 scFv, 条件如下:

25 scFv DNA 的组装和扩增 (50 μ L 体系)

	10×PCR Buffer	5 μ L
	10 mM dNTP	5 μ L
	0.1%BSA	5 μ L
	V _H	100 ng
5	V _L	100 ng
	Linker-primer-Mix	4 μ L
	补水至终体积	50 μ L

先 100 C° 5 min, 0 C° 5 min 后各加入 0.5 μ L Taq DNA 聚合酶, 然后, 94C° 5 min, 94C° 1 min, 60C° 3 min, 9 个循环, 72C° 延伸 10 min。在延伸的后 5 min 里, 每管各加入上下游 RS primer 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L。94C° 1 min, 55C° 45 s, 72C° 40 s, 30 循环, 72C° 延伸 5 min。被扩增的 scFv 片段 5' 和 3' 端分别被引入了 *sfi*I, *Not*I 限制酶切位点。经 *sfi*I 和 *Not*I 双酶切的 pCANTAB 5E 载体 (Pharmacia 公司产品) 与相同酶切的 scFv DNA 按约 3:1 的摩尔比例连接。连接的产物为 pCANTAB5E-scFv。

15 将 pCANTAB5E-scFv 转化大肠杆菌 TG1, 取 10 μ L 转化样品到 SOBAG 平板上。将转化的细胞加入 10 mL 2×YTG (含 2% 的葡萄糖) 培养基, 37C° 震荡培养 2 h, OD₆₀₀ 为 0.8 时, 加入 M13KO7 辅助噬菌体, 至终浓度 10¹⁰ pfu/mL。加氨苄青霉素至终浓度 100 μ g/mL, 继续培养 1 h, 1000 g, 4C° 离心 10 min。沉淀重悬于 100 mL 2×YTAK (含 100 μ g/mL 的氨苄青霉素和

20 50 μ g/mL 卡那霉素), 37C° 250 r/min, 震荡培养过夜。1000 g, 4C° 离心 20 min, 收集上清。加入 1/5 体积的 20% 的 PEG/NaCl 溶液, 冰浴 30-60 min。10000 g, 4C° 离心 20 min, 用 2×YT 重悬沉淀。即得单链抗体噬菌体抗体初级库, 用于单链抗体噬菌体抗体库的富集筛选。筛选过程如下:

1. 将浓度为 2.5-10 μ g/mL rb-PrP^c, 加在 96 孔微孔板中, 100 μ L/孔, 4 C° 包被过夜。
2. PBS (0.1 M, pH7.4) 洗 3 次, 200 μ L/孔。
3. 用含 2% 脱脂奶粉的 PBS 封闭, 200 μ L/孔, 37 C° 封闭 2 h。
4. PBS (0.1 M, pH7.4) 洗 3 次, 200 μ L/孔。

5. 加入上面制备的单链抗体噬菌体抗体库, 100 μL /孔, 37C° 2 h。
 6. PBST (0.1M, pH7.4) 洗 10 次, 200 μL /孔; PBS (0.1 M, pH7.4) 洗 10 次, 200 μL /孔。
 7. 加 Gly-HCl (pH3.0, 100 mM) 100 μL /孔, 37C°, 10 min; 用枪反
5 复吹打洗脱结合的单链抗体噬菌体, 然后加 50 μL /孔 1 mol/L Tris-HCl (pH8.0) 中和 Gly-HCl。
 8. 收集上述液体立即感染对数期 TG1 细胞, 37C° 震荡培养 1 h。
 9. 取 10 μL 涂 SOBAG 平板, 其余的菌体进入下一轮富集筛选。
- pCANTAB5E-Z186 即为通过上述筛选过程筛到的一株单链抗体, 命名
10 为 pCANTAB5E-Z186。其所有测序都在联合基因集团上海博亚基因芯片有限责任公司完成, 序列对比均用软件 MegAlign 完成。单链抗体 scFv 噬菌体展示载体 pCANTAB5E-scFv 的示意图如图 10。

实施例 1. ScFV-Z186-SBP 配基在 SA 芯片表面的固定及再生

15 本发明使用 BIAcore 生物传感器系统 (BIAcore3000), 按照使用说明进行操作。SA 芯片在仪器中锁定后, 首先用 50 mM 的 NaOH (含有 1 M NaCl) 连续注射三次, 每次 1 min, 流速 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。ScFV-Z186-SBP 溶于 running buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20) 中, 终浓度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。待 SPR (表面等离子共振)
20 响应图 (sensorgram) 基线稳定后, 注射配基溶液, 流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, 时间 7 min。为了确定最大结合量, 连续注射三次。经过第一次的注射, 大约有 2700 RU 的响应值 (5 $\mu\text{L}/\text{min}$, 7 min)。连续的注射使响应值上升到 3300 RU 后基本达到饱和, 响应值不再随注射而上升, 见图 3。

对于再生, 向 scFv-Z186-SBP 结合的表面, 首先注射 10 mM 甘氨酸
25 -HCl (pH 2.5) 1 min, 流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, 然后以同样流速注射 10 mM 甘氨酸 -HCl (pH 2.0) 1 min, 最后注射 50 mM NaOH 1 min, 流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。为了测试 SA 芯片表面的捕获能力是否受到再生过程的影响, 重复进行配基的固定及再生过程。

有效的再生对于实验的成功是非常关键的, 不完全的再生或芯片表面
30 捕获活性的降低都会对实验的结果产生负面的效应, 同时也会缩短芯片的

使用寿命。在本实验中，试验了三种再生缓冲液：10 mM 甘氨酸-HCl (pH 2.5), 10 mM 甘氨酸-HCl (pH 2.0)和 NaOH (10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 和 50 mM)。结果表明只有 50 mM NaOH 能很好的去除芯片表面固定的 scFv-Z186-SBP。低于 50 mM 的 NaOH 溶液以及甘氨酸-HCl 缓冲液再生效果都不是很理想。为了验证实验结果的可重复性，连续三次的固定及随后的再生过程被重复进行，结果见图 4。三次重复固定的响应值分别是 636.6 RU, 658 RU, 655.6 RU; 三次再生后基线水平没有明显的改变。

实施例 2. Nano-标签修饰的短肽在 SA 芯片表面的固定及再生

10 Nano-标签修饰的短肽溶于 running buffer 中，终浓度 200 μ g/mL。待 SPR 响应图 (sensorgram) 基线稳定后，注射配基溶液，流速 5 μ L/min, 时间 4 min。为了确定最大结合量，连续注射六次。

本实验中使用的 nano-标签修饰的短肽分子量为 2.2 KD，因为 BIAcore3000 所能检测的分子量下限为 200 D，这表明这种短肽在固定时引起的响应值会较低，见图 5。连续六次注射后，基本上达到了饱和结合，15 响应值为 136 RU。

与实施例 1 完全类似的方法进行再生过程。因为 nano-标签与 streptavidin 的亲和力 (KD \approx 4 nM) 大小要弱于 SBP-标签与 streptavidin 的亲和力 (KD \approx 2.5 nM)，50 mM 氢氧化钠能够使芯片表面很好的再生。在 20 30 μ l/min 的流速下，50 mM 的氢氧化钠注射 1 分钟就可以完全的去掉芯片表面结合的配基。三次重复固定的响应值分别为 53.3 RU, 57.7 RU, 和 56.5 RU。再生前后基线均无明显的漂移，实验的结果见图 6。虽然芯片总的使用寿命没有最后确定，但经过多次重复的实验后，芯片表面的捕获能力没有明显的变化。

25

实施例 3. ScFV-Z186-SBP 和其抗原的结合动力学实验

为了验证本文建立的固定方法的可行性，在同一张芯片 (SA-chip) 上分析了 scFv-Z186-SBP 与其抗原的动力学结合过程。ScFV-Z186-SBP 溶于 running buffer 中，终浓度 20 μ g/mL。抗原的浓度梯度范围为 1430, 715, 30 358, 179, 90 和 0 nM。待 SPR 响应图 (sensorgram) 基线稳定后，注射

ScFv-Z186-SBP 溶液，流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，时间 7 min。考虑到微弱的基线漂移效应，空白对照形成的 sensorgram 从五个浓度梯度中扣除（1430，715，358，179，90 和 0 nM）。每个浓度的抗原注射后，用 running buffer 冲洗 30 min，使结合的抗原自然解离。所有的测试过程保持温度为室温，流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。获得的数据用 evaluation 4.1 software (BIAcore, Sweden) 处理。

scFv-Z186-SBP 与其抗原的动力学反应显示了明显的快结合慢解离的特征曲线，见图 7。抗原的结合在 90~1430 nM 范围内呈现线性的响应，R2 值为 0.9254。在整个动力学反应过程中，结合相时间 3 分钟，解离相 30 分钟。长的解离相时间可以使抗原完全的自然解离，以避免再生过程造成的配基固定量或活性受到影响。所有的动力学参数由 BIA evaluation 4.1 软件处理，结果见表 1。

表 1. scFv-Z186-SBP 和其抗原的动力学分析

K_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_d (s^{-1})	R_{\max} (RU)	KA (M^{-1})	KD (M)	x2
1.5×10^4	6.69×10^{-3}	148	2.24×10^6	4.47×10^{-7}	3.51

在 SPR（表面等离子共振，surface plasmon resonance）试验中，多次的测量和进行实验条件的优化是非常重要的，但 SA 芯片上的配基的不可逆固定使得实验成本非常高昂。基于此，一种可逆的表面化学方法对于此类的实验是非常有益的。Nano-标签和 SBP-标签对于链霉亲和素的结合力的强度适中，介于生物素于 strep 标签之间。由我们的实验结果可以看到，一到两次的一分钟的 NaOH（50 mM）的注射可以使融合有 nano-标签或 SBP-标签的配基从芯片表面完全解离使芯片表面得以再生，同时芯片表面的结合能力并没有丧失。总之，我们通过实验建立了一种新的固定方法，该方法可以使配基实现在 SA 芯片表面的定向的可逆的固定。

阅读了本技术的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本技术作各种改动或修改，但改动或修改的等价形式同样落在本申请权利要求书所限定的范围内。

参考文献

[1] KEEFE A D, WILSON D S, SEELIG B, *et al.*, One-Step Purification of Recombinant Proteins Using a Nanomolar-Affinity Streptavidin-Binding Peptide, the SBP-Tag. *Protein Expression and Purification*, 2001, 5 23(3):440-446.

[2] LAMLA T and ERDMANN V A, The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 2004, 33(1):39-47.

序列表

- 5 <110> 中国科学院生物物理研究所
 <120> 链霉亲和素包被芯片表面的配基的可逆固定
 <130> IB056826
 10 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 15 <211> 38
 <212> PRT
 20 <213> 人工序列
 <400> 1
 Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
 25 1 5 10 15
 Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro
 20 25 30
 Gln Gly Gln Arg Glu Pro
 35
 30 <210> 2
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 2
 40 Asp Val Glu Ala Trp Leu Gly Ala Arg
 1 5
 <210> 3
 45 <211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

5

<400> 3

Asp Val Glu Ala Trp Leu Gly Ala Arg Val Pro Leu Val Glu Thr
1 5 10 15

10

<210> 4

<211> 846

15 <212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

20 atggcccagg tgagctgcag cagtctgggg ctgaactggc aagacctggg gcctcaggtg 60
aagatgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttactagct acacgatgca ctgggtaaaa 120
cagaggcctg gacaggtct ggaatggatt ggatacatta atcctagcag tggttatact 180
aattacaate agaagtcaa ggacaaggcc acattgactg cagacaaatc ctccagcaca 240
gcctacatgc aactgagcag cctgacatct gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga 300
25 gaaggggatt actacggtag tagtggggct tactggggcc aaggaccac ggtcaccgtc 360
tcctcaggtg gaggcggtc aggcggaggt ggctctggcg gtggaggatc ggacattgag 420
ctcaccagct ctccaacaat catgtctgca tctccagggg agaaggtcac catgacctgc 480
agtgccagct caagtgtaag ttacatgcac tggtaccagc agaagtcagg cacctcccc 540
aaaagatgga tttatgacac atccaaactg gcttctggag tccctgctcg cttcagtggc 600
30 tcttactctc tcacaatcag cagcatggag gctgaagatg ctgccactta ttactgccag 660
agtgggtctg ggaccagtg gagtagtaac ccaccacgt tcggctcggg gacaaagttg 720
gaaataaaac ggatggacga gaagaccact ggttggcgag gtggacacgt tgttgaagga 780
ctggctgggg aacttgaaca acttcgtgca cgactggagc atcaccaca aggtcaacgt 840
gaacca 846

35

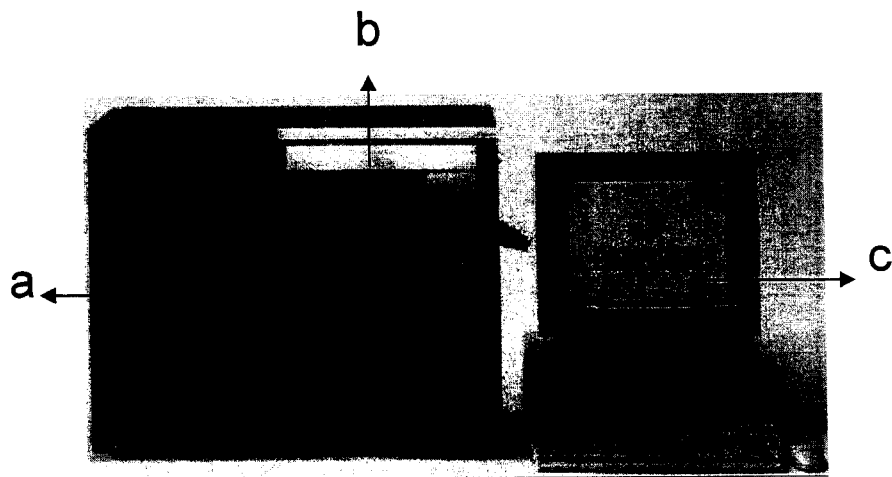


图 1

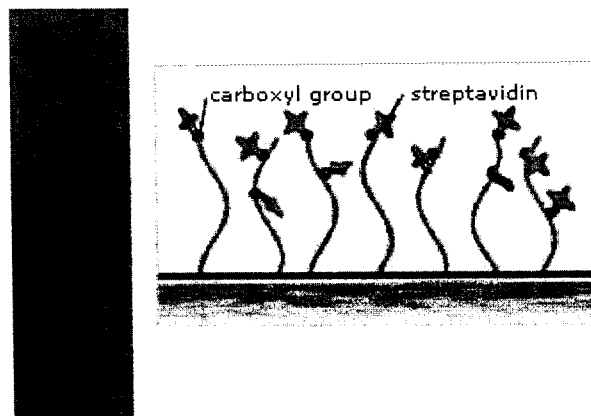


图 2

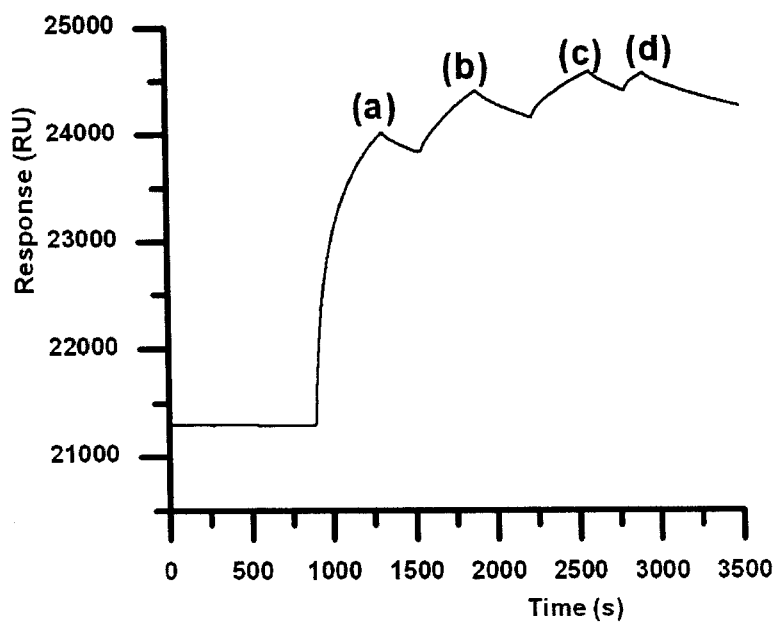


图 3

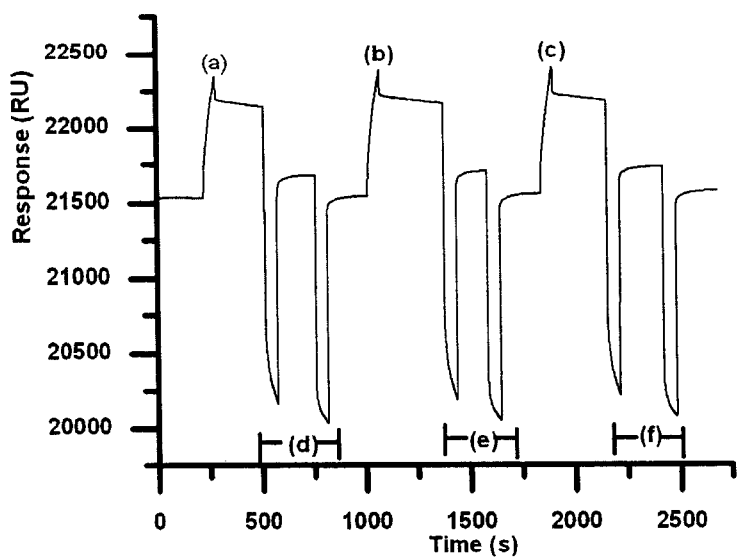


图 4

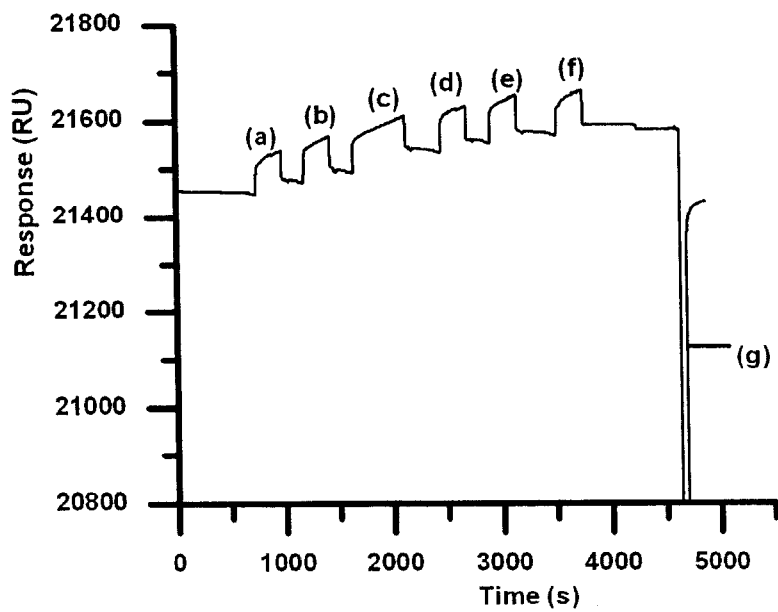


图 5

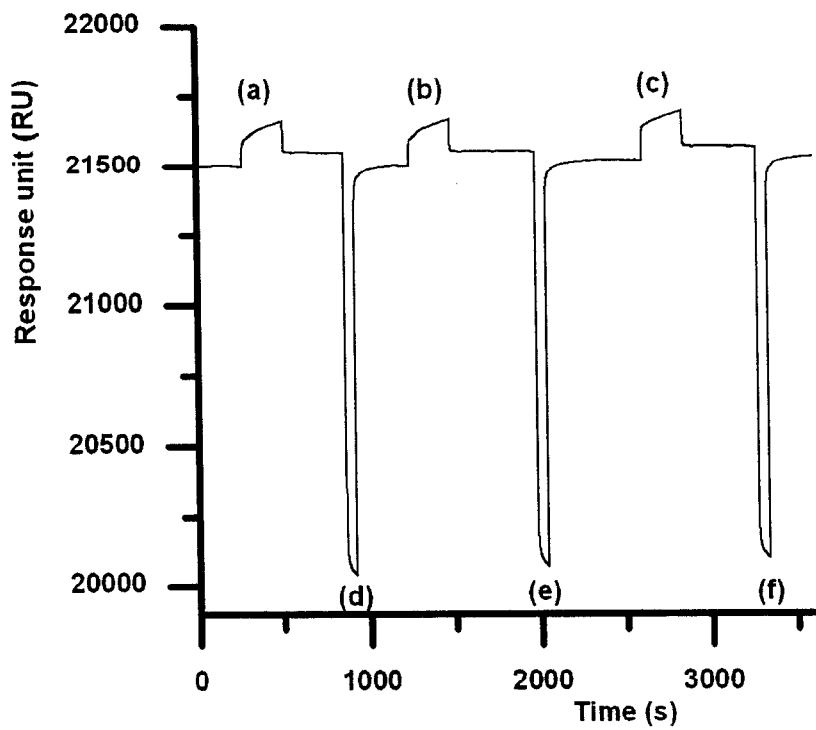


图 6

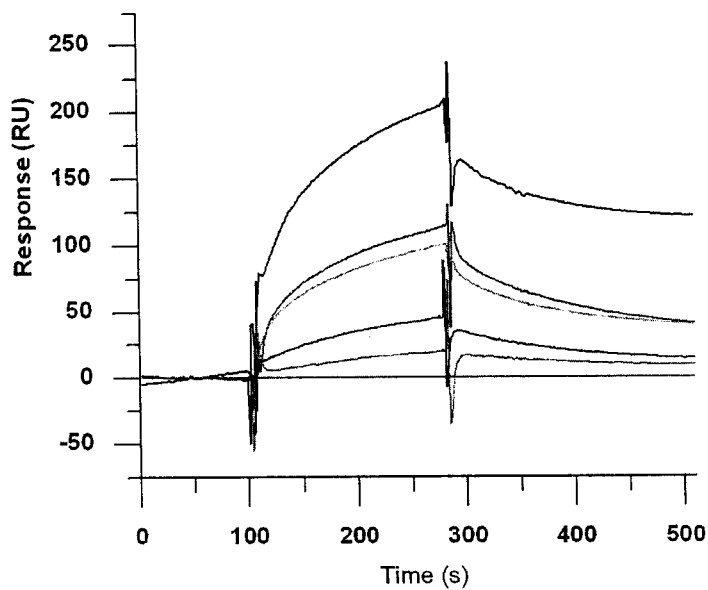


图 7

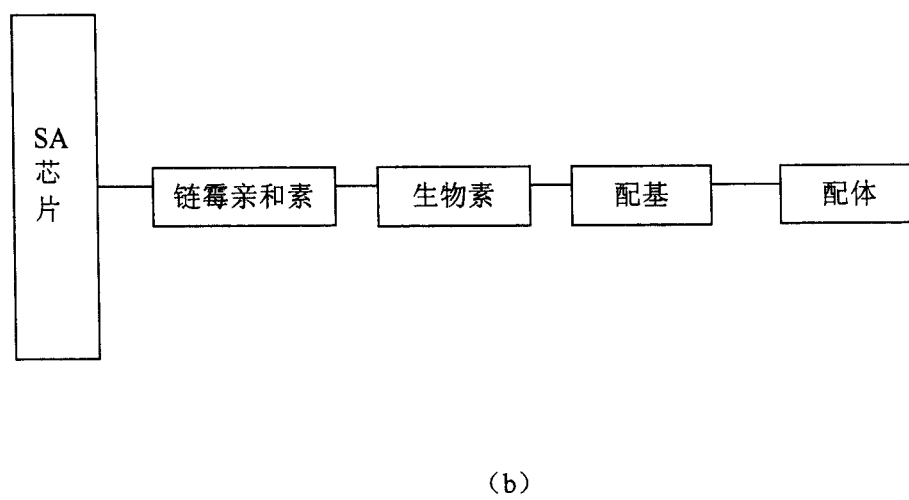
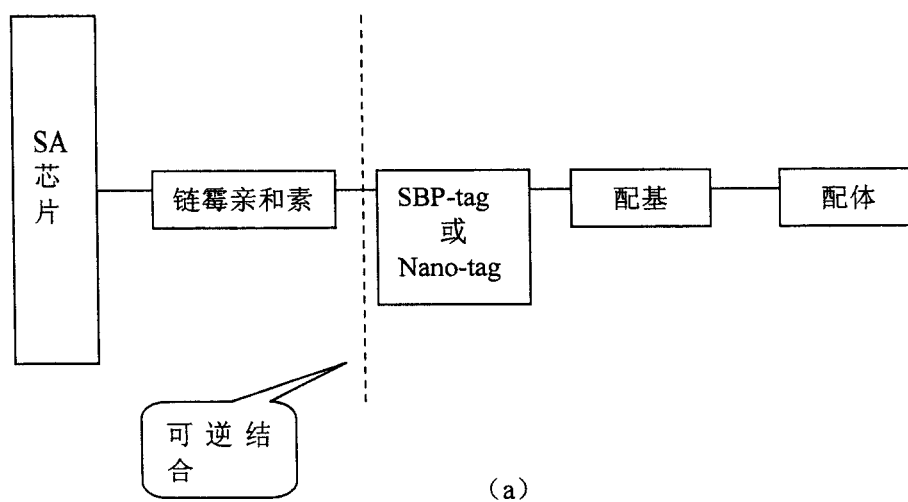


图 8

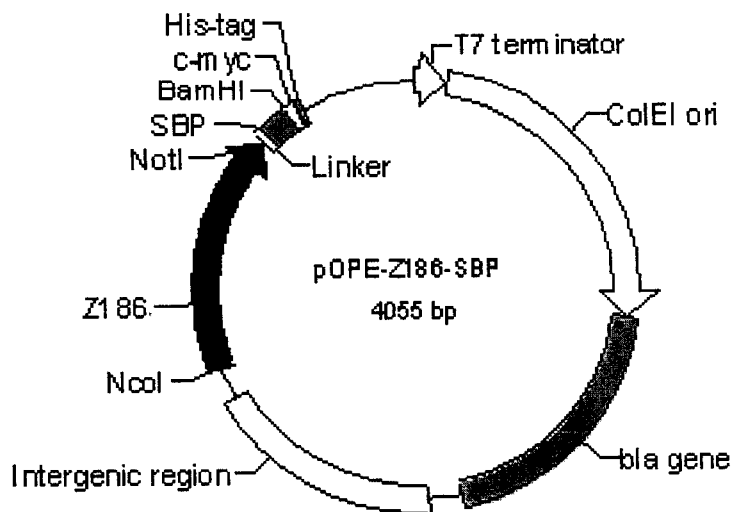


图 9

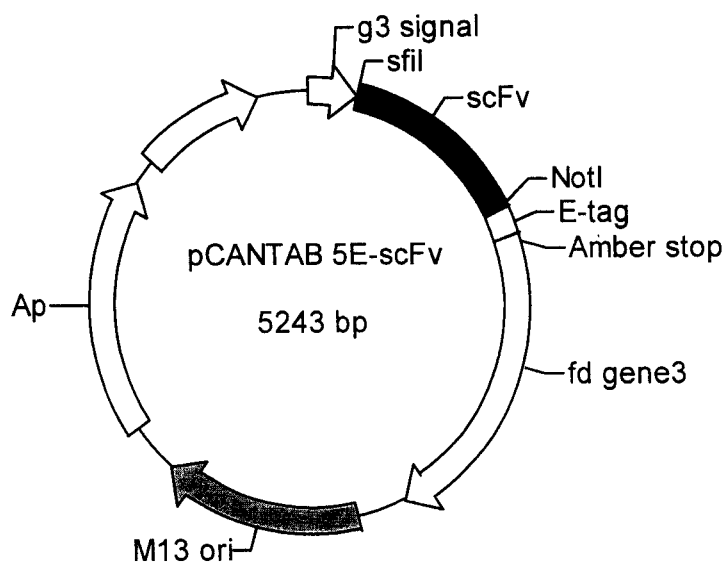


图 10