



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 119019552 B

(45) 授权公告日 2025.06.17

(21) 申请号 202411072634.8

C07K 16/00 (2006.01)

(22) 申请日 2024.08.06

G12N 15/13 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G01N 33/533 (2006.01)

申请公布号 CN 119019552 A

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

(43) 申请公布日 2024.11.26

(56) 对比文件

(73) 专利权人 西湖实验室(生命科学和生物医学浙江省实验室)

CN 108732359 A, 2018.11.02

CN 109627319 A, 2019.04.16

地址 310024 浙江省杭州市转塘街道西湖区石龙山街18号

审查员 李梦华

(72) 发明人 章永登 郑贝 吴旭冬

(74) 专利代理机构 北京金信知识产权代理有限公司 11225

专利代理师 李雪芹 李维盈

(51) Int. Cl.

权利要求书2页 说明书15页

C07K 16/18 (2006.01)

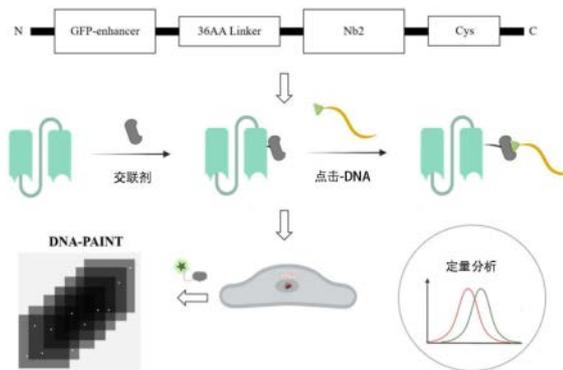
序列表(电子公布) 附图3页

## (54) 发明名称

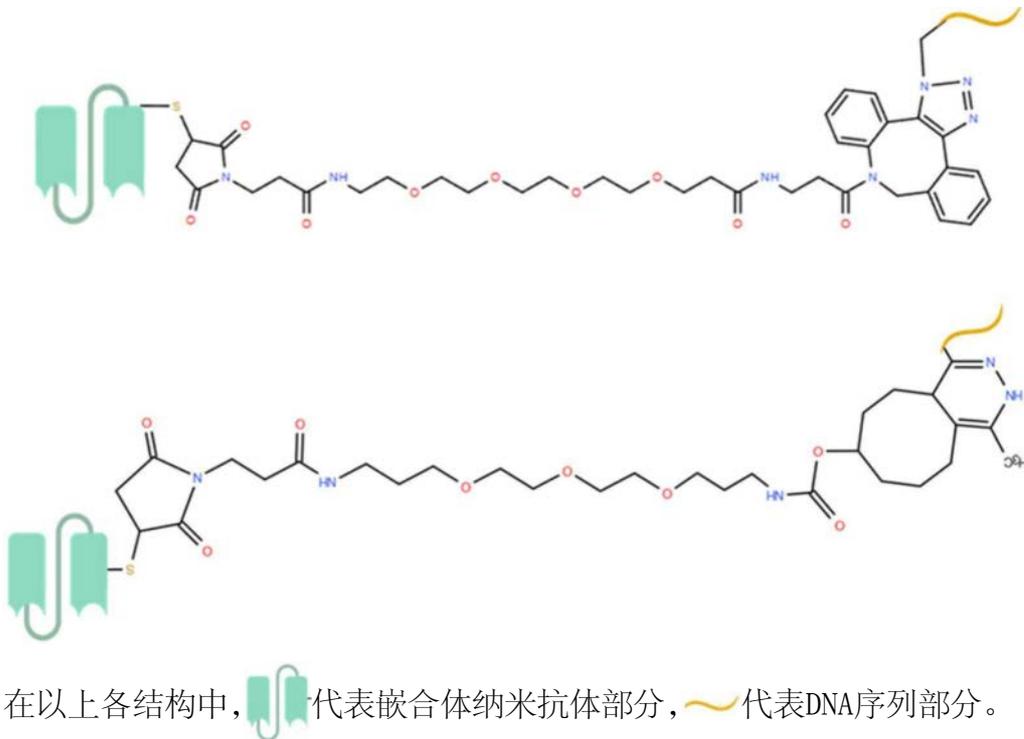
嵌合体纳米抗体、单分子定位成像探针及成像方法

## (57) 摘要

本发明涉及一种嵌合体纳米抗体、单分子定位成像探针及成像方法。本申请的嵌合体纳米抗体从N端到C端依次包含以下序列:NbGFPe纳米抗体序列;36个氨基酸长度的连接子;Nb2纳米抗体序列;以及含有半胱氨酸的C端连接子。本发明的嵌合体纳米抗体有效避免了单一抗体亲和力低、多位点标记的问题,能够实现1:1的高亲和力标记,由其获得的用于DNA-PAINT超分辨成像的探针对细胞内多种精细结构的成像均能获得高质量图像。



1. 一种嵌合体纳米抗体,其从N端到C端依次包含以下序列:  
NbGFPe纳米抗体序列;  
36个氨基酸长度的连接子;  
Nb2纳米抗体序列;以及  
含有半胱氨酸的C端连接子,  
并且,所述嵌合体纳米抗体的氨基酸序列为SEQ ID No:6。
2. 一种重组蛋白,其由如权利要求1所述的嵌合体纳米抗体;以及任选的协助表达和/或纯化的标签序列组成。
3. 一种多核苷酸,其编码如权利要求1所述的嵌合体纳米抗体或如权利要求2所述的重组蛋白。
4. 根据权利要求3所述的多核苷酸,其核苷酸序列为SEQ ID No:9。
5. 一种重组表达载体,其包括如权利要求3或4所述的多核苷酸。
6. 一种转化体,其包括如权利要求3或4所述的多核苷酸或如权利要求5所述重组表达载体。
7. 一种嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针,其包括:  
如权利要求1所述的嵌合体纳米抗体;  
用于DNA-PAINT成像的DNA序列,其核苷酸序列为SEQ ID No:7或SEQ ID No:8;以及  
用于连接所述嵌合体纳米抗体和所述用于DNA-PAINT成像的DNA序列的连接基团。
8. 根据权利要求7所述的嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针,其具有如下所示的结构:



9. 如权利要求7所述的嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针的制备方法,所述方法包括:  
首先使如权利要求1所述的嵌合体纳米抗体与连接剂反应得到带有连接剂的嵌合体纳

米抗体,然后使带有连接剂的嵌合体纳米抗体与用于DNA-PAINT成像的DNA序列反应;或者首先使用于DNA-PAINT成像的DNA序列与连接剂反应得到带有连接剂的DNA序列,然后使带有连接剂的DNA序列与如权利要求1所述的嵌合体纳米抗体反应,或者使如权利要求1所述的嵌合体纳米抗体和用于DNA-PAINT成像的DNA序列同时与连接剂反应,

其中,所述连接剂带有用于与所述嵌合体纳米抗体反应的第一反应基团,以及用于与用于DNA-PAINT成像的DNA序列反应的第二反应基团。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中,所述连接剂的第一反应基团为琥珀酰亚胺基,第二反应基团选自叠氮基、炔基、二苯并环辛炔(DBCO)基、反式环辛烯(TCO)基、四嗪(Tz)基、双环[6,1,0]壬炔基、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基。

11. 一种试剂盒,其包含:如权利要求7或8所述的嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针,以及带有荧光染料的DNA成像链,其中,所述DNA成像链是两端分别带有荧光染料和淬灭基团的DNA序列,其序列为SEQ ID No:10或SEQ ID No:11;所述荧光染料为Cy3B、AT0643,所述淬灭基团为BHQ2、BBQ650。

12. 一种进行DNA-PAINT超分辨成像的方法,所述方法包括以下步骤:

S1': 固定含绿色荧光蛋白的生物样品;

S2': 对S1' 的固定的生物样品进行封闭通透处理;

S3': 加入如权利要求11所述的试剂盒中的嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针孵育S2' 的生物样品;

S4': 采用PBS缓冲液清洗S3' 的生物样品;以及

S5': 向S4' 的生物样品中加入如权利要求11所述的试剂盒中的带有荧光染料的DNA成像链,进行单分子定位超分辨成像。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述生物样品为细胞,所述方法用于对于细胞内的细胞器进行DNA-PAINT超分辨成像,所述细胞器包括:内质网、核孔复合物、微管、高尔基、网格蛋白以及线粒体。

## 嵌合体纳米抗体、单分子定位成像探针及成像方法

### 技术领域

[0001] 本申请涉及荧光成像领域,特别是涉及一种嵌合体纳米抗体、单分子定位成像探针及单分子定位成像方法。

### 背景技术

[0002] 荧光显微成像技术作为一种非侵入性的手段,利用荧光分子标记感兴趣的蛋白,能够直观获取生物样品原位信息。但是,由于光学衍射极限的存在,普通的荧光显微镜的分辨率约为200nm,无法高分辨率地解析分子信息。随着超分辨荧光成像技术的发展,如今围绕着超分辨成像来开展的亚细胞尺度生命活动相关的研究工作受到了广泛的关注。

[0003] 21世纪初诞生的超分辨荧光成像技术凭借纳米级空间分辨率的优点,迅速发展成为生命科学研究中不可或缺的技术手段,非常具有潜力作为一种结构生物学研究方法。2014年,美、德三位科学家因超分辨光学显微成像技术被授予“诺贝尔化学奖”。

[0004] 超分辨成像技术按其工作原理可分为受激发射损耗显微镜(STED)、结构光照明显微镜(SIM)以及单分子定位成像技术(SMLM)。2019年著名华人科学家庄小威,因开发了SMLM并揭示了细胞内隐藏的精密结构而获得“科学突破奖”。根据近些年的发展,发现在亚细胞结构分析上最具潜力的技术是SMLM。

[0005] 单分子定位显微镜(SMLM)技术由于其成像原理简单、空间分辨率极高(一般有20~30nm)的特点,广受科研工作者的青睐。SMLM一般有光激活定位显微镜(PALM)、随机光学重构显微术(STORM)以及利用荧光分子与靶标的可逆结合的纳米尺度点累积形貌成像(DNA-PAINT)这三类。一般而言,SMLM技术的原理是利用宽场照明的方式,利用荧光分子的闪烁性质,在每一帧成像时仅激活部分荧光分子,采集不同时间点的图像,通过算法重构出打破光学衍射极限的超分辨图像。

[0006] 目前,研究人员已在SMLM的仪器硬件、图像处理算法以及样品制备等多方面改进优化,并逐步将这项技术应用到生物学领域。例如,利用STORM和PALM等成像技术陆续实现了对染色质、中心粒、核孔复合物、线粒体、内质网以及细胞骨架等诸多亚细胞结构的精细观察;此外,利用这些技术可直观、可视地获得细胞中基因组DNA、蛋白质等重要生物大分子纳米尺度的空间分布情况和组织特性,从而对分子间的共定位关系和相互作用网络进行更加精准且全面的分析。

[0007] SMLM数据不仅包含荧光团的空间位置信息,还包括荧光团的数量信息(如定位数和闪烁动力学)。为了实现定量分析的目标,研究人员使用单分子定位数据的时空信息,建立复杂的染料分子光物理模型,进行可视化定量分析。由文献报道可知,基于常规染料或者荧光蛋白分子的STORM/PALM技术存在一定的局限性:一是,常规的染料分子闪烁和再激活机制尚不清晰,存在光漂白问题,会导致计数不准确,目前没有较好的解决方案,这阻碍了蛋白定量分析;二是,蛋白在细胞中的分布存在异质性,尺度范围广(几十纳米到几百纳米),分布形态各异,大范围实现高精度和高密度的定位成像难度大,亟需发展多样的定量评估标准。针对目标蛋白的原位高分辨定量分析仍处于起步阶段,迫切需要更好的分析方

法填补此处洼地。

[0008] 常规的标记方式是利用抗体(150kDa)的免疫荧光策略,抗体的尺寸约10nm,无法自由进入细胞膜,因此标记胞内蛋白需要破膜处理,这会影响样本的生理结构,无法实现高效率标记。此外,常规的免疫荧光是采用一抗加二抗的标记策略,抗体上的染料分子与目标蛋白分子之间的距离较大,这会带来较大的连接误差,降低单分子定位的分辨率。目前,为了减小标记大小,多种标记技术被开发出来,包括Fab片段抗体、纳米抗体、荧光蛋白、短肽标签、SNAP-tag标签以及HaloTag标签等,这些均能将标记大小控制在5nm以下。

[0009] 得益于基因重组技术,纳米抗体介导的多种标记方式提供了一种简单通用的方法标记众多的GFP和RFP衍生的融合结构,可用于先进的单分子成像应用。随着单分子定位超分辨成像技术的日益更新,研究者对使用纳米抗体标记提出了更高的要求,不仅需要特异性强、高亲和力的抗体,且能实现1:1标记的定量探针。

[0010] 鉴于技术的发展和应用的的需求,发展新型有效的纳米抗体探针和基于其建立单分子定位超分辨成像分析方法就显得十分重要。

## 发明内容

[0011] 本发明的技术目的之一是提供一种可用于单分子成像的嵌合体纳米抗体,其能够实现高亲和力结合的同时实现1:1标记,较小的标记连接误差,有利于进行定量分析的单分子定位超分辨成像方法。

[0012] 本发明的另一技术目的是提供一种嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针。

[0013] 本发明的又一技术目的是提供上述嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针的制备方法。

[0014] 本发明的又一技术目的是提供一种用于单分子定位成像的试剂盒。

[0015] 本发明的又一技术目的是提供单分子定位超分辨荧光成像方法。

[0016] 一方面,本发明提供一种可用于单分子成像的嵌合体纳米抗体,其从N端到C端依次包含以下序列:

[0017] NbGFPe纳米抗体序列;

[0018] 36个氨基酸长度的连接子;

[0019] Nb2纳米抗体序列;以及

[0020] 含有半胱氨酸的C端连接子。

[0021] 在具体实施方式中,NbGFPe纳米抗体氨基酸序列为:SEQ ID No:1。

[0022] 在具体实施方式中,所述36个氨基酸长度的连接子的氨基酸序列为:SEQ ID No:2。

[0023] 在具体实施方式中,Nb2纳米抗体氨基酸序列为:SEQ ID No:3。

[0024] 在具体实施方式中,含有半胱氨酸的C端连接子的氨基酸序列为:SEQ ID No:4或SEQ ID No:5,或者含有半胱氨酸的C端连接子仅为单个半胱氨酸。

[0025] 在具体实施方式中,所述嵌合体纳米抗体的氨基酸序列为SEQ ID No:6。

[0026] 另一方面,本发明提供一种重组蛋白,其包括:上述嵌合体纳米抗体;以及任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

[0027] 又一方面,本发明提供一种多核苷酸,其编码上述嵌合体纳米抗体或上述重组蛋

白。

[0028] 在具体实施方式中,所述多核苷酸的核苷酸序列为SEQ ID No:9。

[0029] 又一方面,本发明提供一种重组表达载体,其包括上述多核苷酸。

[0030] 又一方面,本发明提供一种转化体,其包括上述多核苷酸或上述重组表达载体。

[0031] 又一方面,本发明提供一种嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针,其包括:

[0032] 上述嵌合体纳米抗体;

[0033] 用于DNA-PAINT成像的DNA序列,其核苷酸序列为SEQ ID No:7或SEQ ID No:8;以及

[0034] 用于连接所述嵌合体纳米抗体和所述用于DNA-PAINT成像的DNA序列的连接基团。

[0035] 在根据本发明的嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针中,所述嵌合体纳米抗体和用于DNA-PAINT成像的DNA序列可以通过任何合适的连接基团连接,而没有特别限制。例如,所述连接基团可以一端通过嵌合体纳米抗体末端的巯基连接到嵌合体纳米抗体,另一端连接到用于DNA-PAINT成像的DNA序列的3'端。

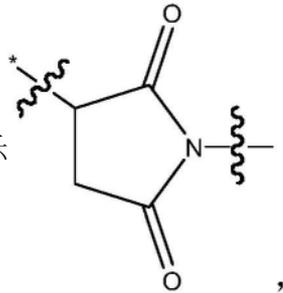
[0036] 在具体实施方式中,所述连接基团具有下式I所示的结构:

[0037] \*-R-linker1-Mal' -\*\*

[0038] I

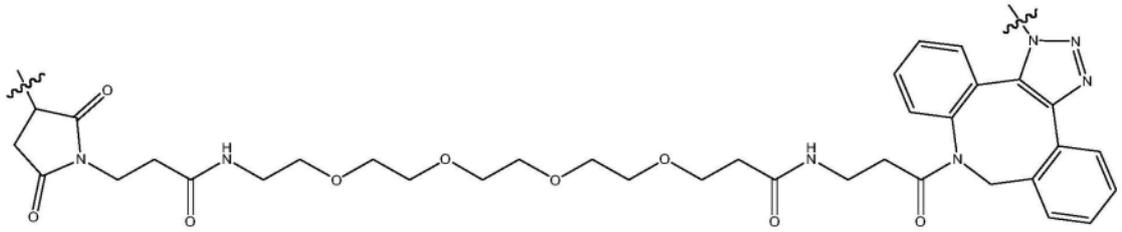
[0039] 其中,R表示通过氨基反应性基团或点击化学形成的连接基团,其实例例如可以为DBCO与叠氮反应形成的基团,TCO与Tz反应形成的基团、NHS酯与氨基反应形成的酰胺基团;Linker1表示C2-C10亚烷基,所述C2-C10亚烷基在其主链中可以任选地额外包含酯基、酰胺基和/或-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-所表示的PEG链,其中n选自1-10的整数,例如n为3或4,

[0040] Mal' 表示

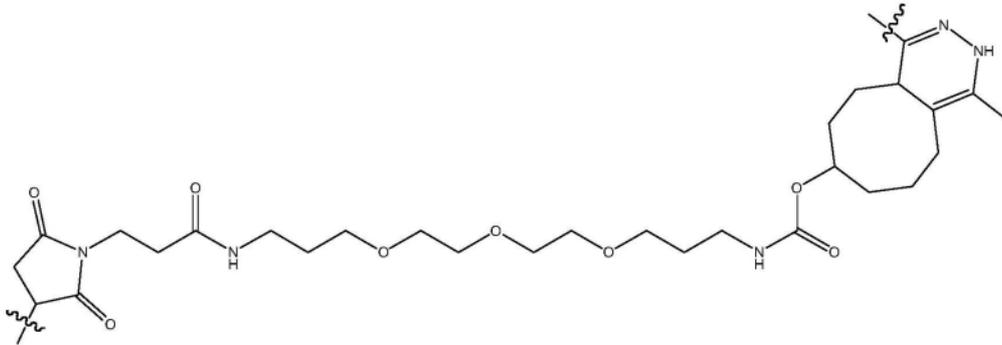


[0041] \*表示与DNA序列的3'端连接的位置,\*\*表示与嵌合体纳米抗体连接的位置。

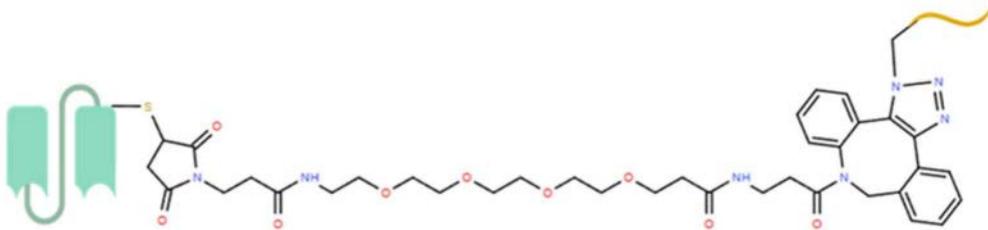
[0042] 在具体实施方式中,所述连接基团选自



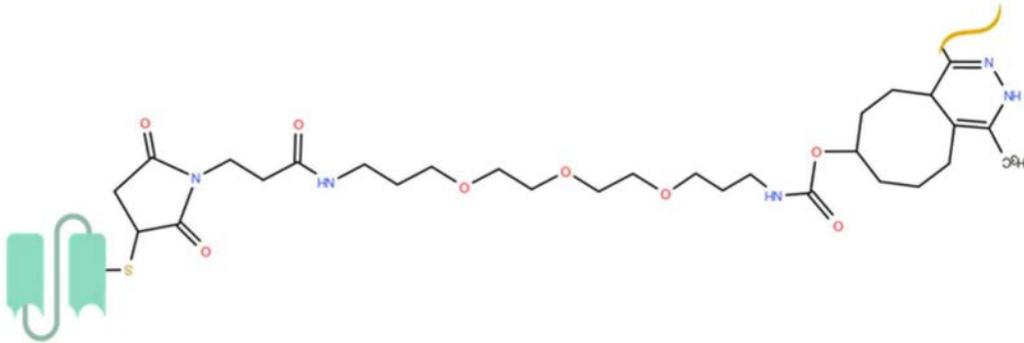
[0043]



[0044] 在具体实施方式中,所述嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针具有如下所示的结构:



[0045]



[0046] 在以上各结构中,  代表嵌合体纳米抗体部分,  代表DNA序列部分。

[0047] 又一方面,本发明提供上述嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针的制备方法。所述方法可以采用任何合适的方式进行。例如,可以首先使根据本发明的嵌合体纳米抗体与连接剂反应得到带有连接剂的嵌合体纳米抗体,然后使带有连接剂的嵌合体纳米抗体与用于DNA-PAINT成像的DNA序列反应得到根据本发明的嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针;或者可以首先使用用于DNA-PAINT成像的DNA序列与连接剂反应得到带有连接剂的DNA序列,然后使带有连接剂的DNA序列与根据本发明的嵌合体纳米抗体反应得到根据本发明的嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针,或者可以使根据本发明的嵌合体纳米抗体和用于DNA-

PAINT成像的DNA序列同时与连接剂反应得到根据本发明的嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针。因此,连接剂带有用于与根据本发明的嵌合体纳米抗体反应的第一反应基团,以及用于与用于DNA-PAINT成像的DNA序列反应的第二反应基团。所述第一反应基团和第二反应基团可以参考根据本发明的嵌合体纳米抗体具有或者可以形成的反应基团以及用于DNA-PAINT成像的DNA序列具有或者可以形成的反应基团进行设计和选择。

[0048] 在一些实施方式中,所述连接剂的第一反应基团为琥珀酰亚胺基,第二反应基团选自点击化学中常用的功能基团,例如叠氮基、炔基、二苯并环辛炔(DBCO)基、反式环辛烯(TCO)基、四嗪(Tz)基、双环[6,1,0]壬炔基、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基等,但不限于此。

[0049] 在具体实施方式中,所述方法包括以下步骤:

[0050] S1:将上述嵌合体纳米抗体还原得到具有游离巯基的嵌合体纳米抗体;

[0051] S2:使S1得到的嵌合体纳米抗体与下式II所示的交联剂反应得到连接有交联剂的嵌合体纳米抗体,其中嵌合体纳米抗体上的巯基与交联剂中的马来酰亚胺基团之间进行特异性反应,形成不可逆的硫醚键:

[0052]  $R_2$ -linker1-Mal

[0053] II

[0054] 在式II中, $R_2$ 表示反应性基团,例如为氨基反应性基团、点击化学反应性基团;

[0055] Linker1如上文式I中所定义,



[0057] S3:将S2的反应产物与下式II的带有反应性基团 $R_3$ 的用于DNA-PAINT成像的核酸序列反应得到修饰有DNA的嵌合体纳米抗体探针,也即上述嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针。

[0058]  $R_3$ -DNA

[0059] II

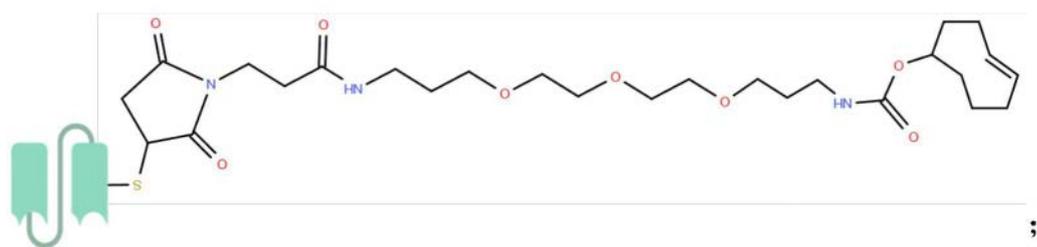
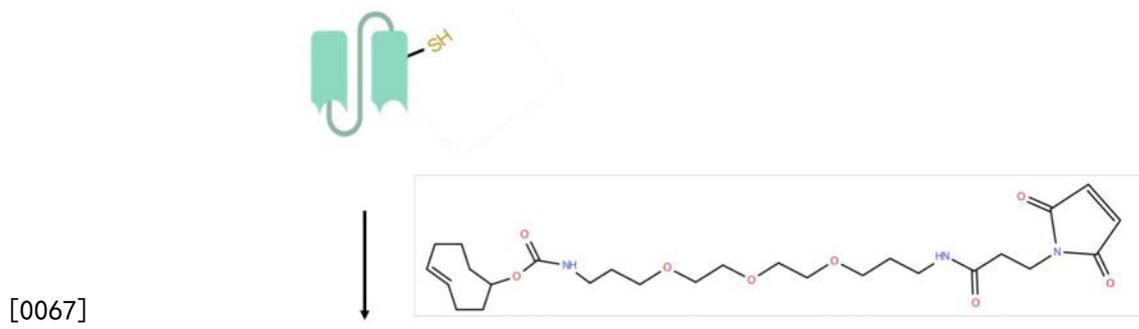
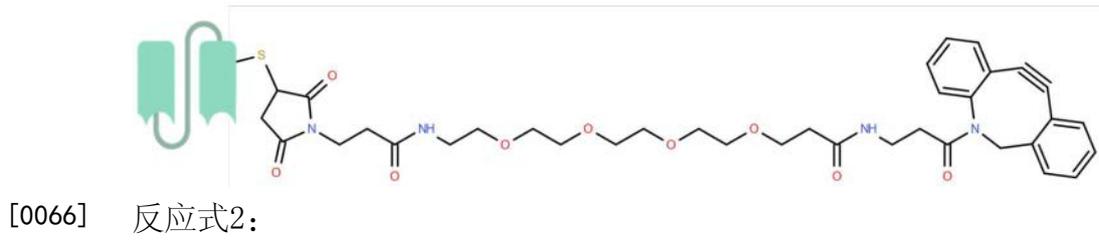
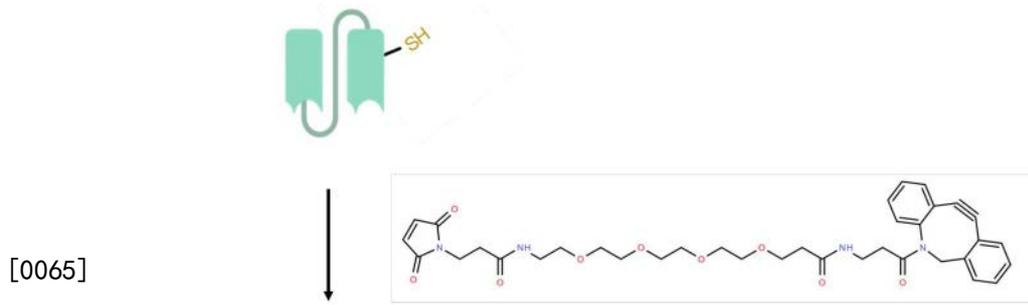
[0060] 在式II中, $R_3$ 表示可与上述 $R_2$ 发生反应以产生连接的基团;DNA序列选自SEQ ID No:7或SEQ ID No:8,其中,上述DNA序列中的核苷酸可以为左旋核苷酸或者右旋核苷酸。

[0061] 在具体实施方式中, $R_2$ 为二苯并环辛炔(DBCO)基,且 $R_3$ 为叠氮基;或者 $R_2$ 为反式环辛烯(TCO)基,且 $R_3$ 为四嗪(Tz)基;或者 $R_2$ 为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基,且 $R_3$ 为氨基。

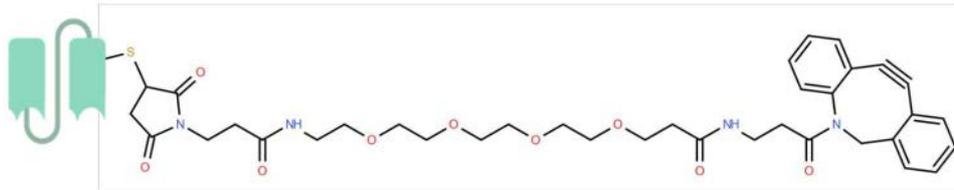
[0062] 在具体实施方式中,S2中使用的交联剂为DBCO-PEG<sub>4</sub>-Maleimide;S3中使用的用于DNA-PAINT成像的核酸序列为SEQ ID No:7。

[0063] 在具体实施方式中,S2中的反应可以如以下反应式1或2所示,

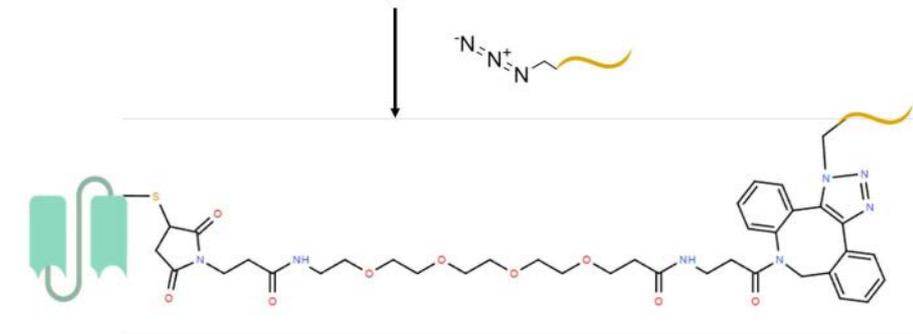
[0064] 反应式1:



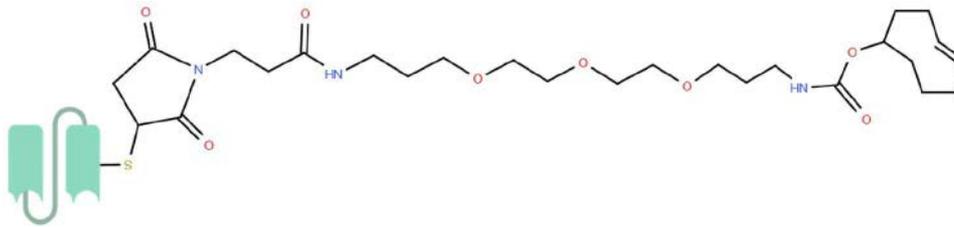
[0068] S3中的反应可以如以下反应式3或4所示,反应式3:



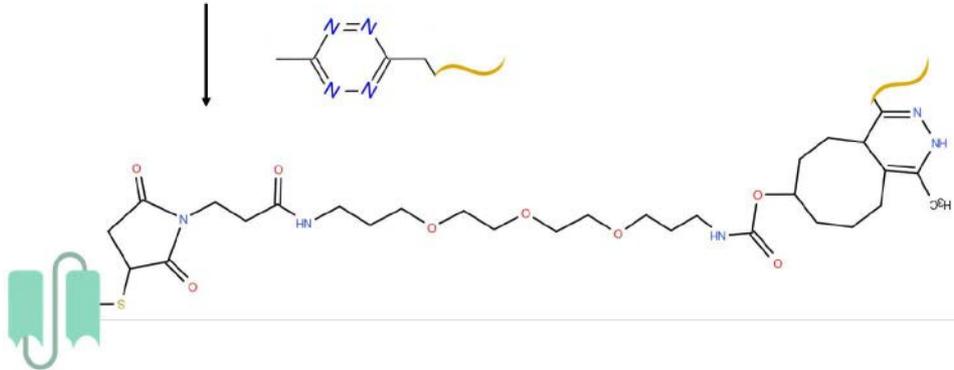
[0069]



[0070] 反应式4:



[0071]



[0072] 在以上各反应式中，代表嵌合体纳米抗体部分，代表核酸序列部分。

[0073] 在具体实施方式中，S1中使用的还原剂选自三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)溶液。

[0074] 在具体实施方式中，在S2中，交联剂与已还原的嵌合体纳米抗体的摩尔比约为5~20。

[0075] 在具体实施方式中，在S3中，用于DNA-PAINT成像的核酸序列与连接有交联剂的嵌合体纳米抗体的摩尔比为3~10。

[0076] 在具体实施方式中，上述制备方法还可以包含纯化步骤S4以纯化S3的修饰有DNA的嵌合体纳米抗体探针。在S4中，可以利用分子筛和离子交换技术纯化S3的修饰有DNA的嵌合体纳米抗体探针。

[0077] 在具体实施方式中，在S1-S3中，反应温度均为4℃；S1的反应时间为0.5h~2h；S2

的反应时间为2h~16h;S3的反应时间为1h~16h。

[0078] 另一方面,本发明提供一种试剂盒,其包含:上述嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针,以及带有荧光染料的DNA成像链。

[0079] 在具体实施方式中,所述DNA成像链指的是DNA序列的两端分别带有荧光染料和淬灭基团,其序列可以为SEQ ID No:10或SEQ ID No:11;所述荧光染料可以为Cy3B、AT0643,所述淬灭基团可以是BHQ2、BHQ650。所述带有荧光染料的DNA成像链可以通过引物合成公司定制而形成,并且可以由右旋碱基原料或左旋碱基原料合成。

[0080] 在具体实施方式中,所述带有荧光染料的DNA成像链的序列为SEQ IDNo:10。该序列是针对DNA-PAINT成像方法进行了特殊的序列设计,也即,成像序列和对接序列不是完全互补配对,实现序列直接快速结合和脱落,实现快速反应动力学,这能够有效实现快速低背景的单分子定位超分辨成像。

[0081] 再一方面,本发明提供一种进行DNA-PAINT超分辨成像的方法,所述方法包括以下步骤:

[0082] S1':固定含绿色荧光蛋白的生物样品;

[0083] S2':对S1'的固定的生物样品进行封闭通透处理;

[0084] S3':加入上述嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针孵育S2'的生物样品;

[0085] S4':采用PBS缓冲液清洗S3'的生物样品;以及

[0086] S5':向S4'的生物样品中加入上述带有荧光染料的DNA成像链,进行单分子定位超分辨成像。

[0087] 本申请的标记方法不受细胞系的限制,理论上针对带有绿色荧光蛋白标签的生物样品均可实现很好的标记。对于不同的生物样品的固定方法不做限制,本领域的技术人员针对不同的生物样品可以选择实施最佳结构固定方案。对于不同生物样品的封闭通透处理方法不做限制,本领域的技术人员针对不同的生物样品可以选择实施最佳封闭通透处理方法。

[0088] 在具体实施方式中,生物样品为细胞,所述方法用于对于细胞内的细胞器进行DNA-PAINT超分辨成像,所述细胞器包括:内质网、核孔复合物、微管、高尔基、网格蛋白以及线粒体等。

[0089] 本发明不仅仅可用于常规的表达有绿色荧光蛋白的细胞器的标记成像,也可以用于带有绿色荧光蛋白的生物组织样品。

[0090] 有益效果

[0091] 本发明通过基因重组技术将两种单一的纳米抗体设计成一种新颖的嵌合体纳米抗体,有效避免了单一抗体亲和力低、多位点标记的问题,能够实现1:1的高亲和力标记。经本发明所述方法改造的基因序列在诱导表达后能够获得分子量对应的嵌合体纳米抗体,进一步地通过位点特异性和点击化学修饰的方式能够获得用于DNA-PAINT超分辨成像的探针,其对细胞内多种精细结构的成像均能获得高质量图像。

## 附图说明

[0092] 图1:本发明的嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针的构建及用于定量分析的单分子定位超分辨荧光成像的示意图。

[0093] 图2:嵌合体纳米抗体的位点特异性修饰示意图。

[0094] 图3:嵌合体纳米抗体修饰DNA色谱纯化图(分子筛SEC和离子交换色谱IEX)和SDS-PAGE验证图。

[0095] 图4:两种不同的嵌合体纳米抗体的内质网超分辨成像示意图。

[0096] 图5:不同抗体在核孔复合物结构标记上的超分辨成像图。

### 具体实施方式

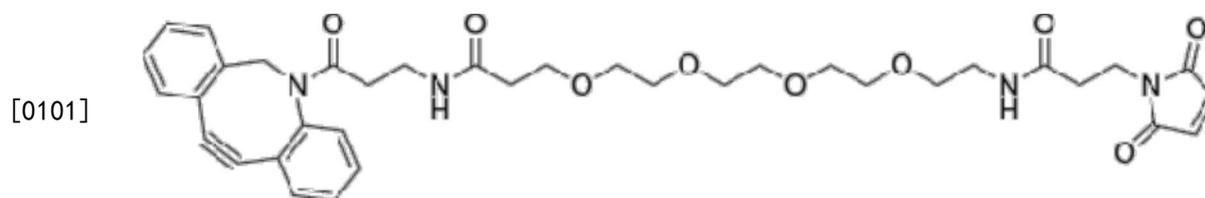
[0097] 为了更好的理解本发明,下面结合实施例进一步阐明本发明的内容。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0098] 材料信息:

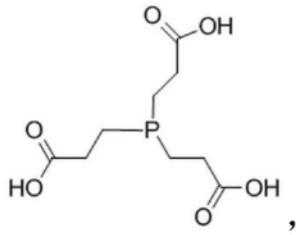
货号	名称	公司
----	----	----

	760676	DBCO-PEG4-Maleimide	Sigma-Aldrich
	790443	TCO-PEG3-Maleimide	Sigma-Aldrich
	UFC5010	Amicon Ultra-0.5 离心过滤装置 10 kDa	Sigma-Aldrich
	C4706	TCEP	Sigma-Aldrich
	89883	Zeba™ 脱盐离心柱, 7K MWCO, 0.5 mL	Thermo Fisher
	Azide-DNA	5'-3': CCTTCAACATATCCTCTAC-Azide(SEQ ID No:7)	宁波康贝生化有限公司
	DNA 成像链 P10	5'-3': Cy3B - AGAAGTAATGTGGAA - BHQ2(SEQ ID No:10)	宁波康贝生化有限公司
[0099]	BC204	Rosetta(DE3)	博迈德
	AK177-25G	Kanamycin sulfate	Genview
	YDB0102	2X YT Broth	Formedium
	10010023	1×PBS pH 7.4	Gibco
	-	U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP	Cell Line Services
	CRL-1651	COS-7	ATCC
	CCL-2	HeLa	ATCC
	15710	16% PFA, 多聚甲醛	Electron Microscopy Sciences
	16020	8%GA, 戊二醛	Electron Microscopy Sciences
	001-000-162	Bovine Serum Albumin, BSA, 牛血清白蛋白	Jackson
	X100-500ML	Triton X-100	Sigma-Aldrich

[0100] DBCO-PEG4-Maleimide, 二苯并环辛炔-四聚乙二醇-马来酰亚胺, 结构式如下:

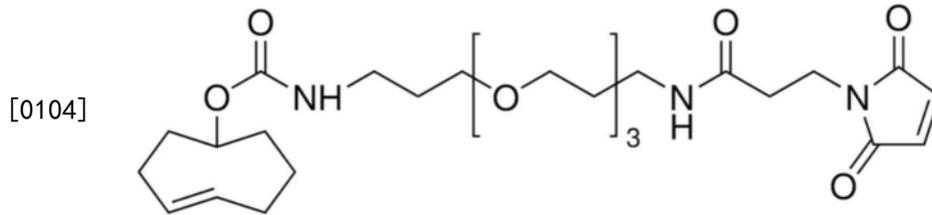


[0102] TCEP, 全称为 Tris (2-carboxyethyl) phosphine, 结构式如下:



通常以盐酸盐的形式使用。

[0103] TC0-PEG3-Maleimide,反式环辛烯-聚乙二醇-马来酰亚胺,结构式如下:



[0105] 单分子定位超成像技术在定量解析细胞内原位精细结构时存在探针标记大小和标记比例问题。针对常见的融合蛋白GFP,Ziyue Zhang等人(Zhang,Z.,Wang,Y.,Ding,Y.et al.Structure-based engineering of anti-GFP nanobody tandems as ultra-high-affinity reagents for purification.Sci Rep 10,6239(2020).<https://doi.org/10.1038/s41598-020-62606-7>)公开了将两个不同的纳米抗体连接形成的新型嵌合体纳米抗体(NbGFPe-LaG16)具有较高亲和力以及一对一标记的特点,但是该纳米抗体并未在超分辨成像领域实施。本发明以超分辨成像探针为切入点,设计并纯化了NbGFP-36AAlinker-Nb2-Cys这类全新的嵌合体纳米抗体,可用于后续位点特异性修饰上用于超分辨成像的探针,从而实现细胞内精细结构的原位成像解析和定量分析。本申请的嵌合体纳米抗体(NbGFPe-Nb2)相比较文献已报道的抗体(NbGFPe-LaG16)实质区别是在超分辨成像领域成像效果更好,在展示更好的特异性时兼具一对一标记的特点。

[0106] 图1示出本发明的嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针的构建及用于定量分析的单分子定位超分辨荧光成像的示意图。如图中所示,本申请首先构建了嵌合体纳米抗体,其包含NbGFPe纳米抗体序列、36个氨基酸长度的连接子、Nb2纳米抗体序列以及用于位点特异性修饰的含有半胱氨酸的C端连接子。在此基础上,利用点击化学方式将嵌合体纳米抗体与用于DNA-PAINT成像的核酸序列连接形成嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针。之后利用该嵌合体纳米抗体单分子定位成像探针以及设计的带有荧光染料的DNA成像链对细胞内不同细胞器进行DNA-PAINT超分辨成像,以便定量分析目标。

[0107] 实施例1:嵌合体纳米抗体的设计、表达和纯化

[0108] 本实施例设计了目标蛋白基因片段,然后将目的基因片段构建到pET26b表达载体中,转化至大肠杆菌Rosetta(DE3)中进行诱导表达蛋白,纯化获得目的蛋白。

[0109] 具体的操作步骤如下:

[0110] 步骤一:两种单独的NbGFPe和Nb2纳米抗体核苷酸序列信息分别为SEQ ID No:12和13;

[0111] NbGFPe:(SEQ ID No:12)

[0112] CAGGTCCAACCTGGTTGAGTCTGGAGGGCGTTGGTGCAGCCCGTGGGAGCCTTCGTCTTTCCTGTGCGCCAGTGGATTCCCTGTAAACCGTTATAGTATGCGTTGGTATCGTCAAGCTCCTGGCAAAGAGCGTGAATGGGTGGCCGGAATGTCATCGGCCGCGATCGCAGTAGTTACGAAGATTCGGTTAAAGCCGTTTCACCATTAGTCGTGACGACG

CCCCTAACACGGTTTATCTGCAGATGAATAGTTTAAAACCTGAAGACACAGCAGTATATTATTGCAATGTAAACGTA  
GGATTTCGAATATTGGGGTCAGGGTACACAGGTAACAGTGTCTGCA

[0113] Nb2: (SEQ ID No:13)

[0114] CAGGTTTCAGTTGCAGGAATCGGGAGGTGGTAGTGTTCAGGCTGGCGGATCGCTGCGCCTTTCCTGCGCG  
GCCTCCGGGCCACGTATAGTTTCATATTTTCATGGCATGGTTCCGTCAGCCCCCGGTATGGAACGTGAAGGCGTGGC  
TGCAAGCAGTTACGACGGGAGCACGACATTGTATGCGGACTCAGTAAAGGGCCGCTTACCATTAGTCAAGGTAATG  
CTAAGAACACAAAGTTCTTGTGTTGAATAATCTTGAGCCCGAAGATACGGCGATCTACTATTGTGCTTTACGCCGT  
CGTGGCTGGTCAAATACGTCGGGCTGGAAACAGCCAGGTTGGTACGACTATTGGGGTCAAGGCACGCAAGTAACCGT  
CAGTTCT

[0115] 步骤二:设计将两个纳米抗体连接的36个氨基酸长度的连接子的核苷酸序列,即  
36AAlinker:SEQ ID No:14。

[0116] 36AAlinker: (SEQ ID No:14)

[0117] GGCGGTAGTGCTGCTTCCGGTGGAGCATCAGCTAGTGGAGGTACGGGCGGATCCGGAGGGACTTCGGCT  
TCCGGTGCTTCTGCCGGCGGATCCGGTGGAGCTGGTACT

[0118] 最终形成的目的核苷酸序列是NbGFPe-36linker-Nb2-Cys (SEQ ID No:9)。

[0119] CAGGTCCAACCTGGTTGAGTCTGGAGGGCGTTGGTGCAGCCCGGTGGGAGCCTTCGTCTTTCCTGTGCG  
GCCAGTGGATTCCCTGTTAACCGTTATAGTATGCGTTGGTATCGTCAAGCTCCTGGCAAAGAGCGTGAATGGGTGGC  
CGGAATGTCATCGGCCGGCGATCGCAGTAGTTACGAAGATTCGGTTAAAGGCCGTTTACCATTAGTCGTGACGACG  
CCCCTAACACGGTTTATCTGCAGATGAATAGTTTAAAACCTGAAGACACAGCAGTATATTATTGCAATGTAAACGTA  
GGATTTCGAATATTGGGGTCAGGGTACACAGGTAACAGTGTCTGTCAGGCGGTAGTGTCTTCCGGTGGAGCATCAGC  
TAGTGGAGGTACGGGCGGATCCGGAGGGACTTCGGCTTCCGGTGCTTCTGCCGGCGGATCCGGTGGAGCTGGTACTC  
AGGTTTCAGTTGCAGGAATCGGGAGGTGGTAGTGTTCAGGCTGGCGGATCGCTGCGCCTTTCCTGCGCGGCCTCCGGG  
CCCACGTATAGTTTCATATTTTCATGGCATGGTTCCGTCAGCCCCCGGTATGGAACGTGAAGGCGTGGCTGCAAGCAG  
TTACGACGGGAGCACGACATTGTATGCGGACTCAGTAAAGGGCCGCTTACCATTAGTCAAGGTAATGCTAAGAACA  
CAAAGTTCTTGTGTTGAATAATCTTGAGCCCGAAGATACGGCGATCTACTATTGTGCTTTACGCCGTCGTGGCTGG  
TCAAATACGTCGGGCTGGAAACAGCCAGGTTGGTACGACTATTGGGGTCAAGGCACGCAAGTAACCGTCAGTTCTAA  
GGATGACAAATCCTGCGGCAAAGACAAAGAT

[0120] 对照实验所用到的相关抗体的核苷酸序列如下:

[0121] NbGFPe-Cys: (SEQ ID No:15)

[0122] CAGGTCCAACCTGGTTGAGTCTGGAGGGCGTTGGTGCAGCCCGGTGGGAGCCTTCGTCTTTCCTGTGCG  
GCCAGTGGATTCCCTGTTAACCGTTATAGTATGCGTTGGTATCGTCAAGCTCCTGGCAAAGAGCGTGAATGGGTGGC  
CGGAATGTCATCGGCCGGCGATCGCAGTAGTTACGAAGATTCGGTTAAAGGCCGTTTACCATTAGTCGTGACGACG  
CCCCTAACACGGTTTATCTGCAGATGAATAGTTTAAAACCTGAAGACACAGCAGTATATTATTGCAATGTAAACGTA  
GGATTTCGAATATTGGGGTCAGGGTACACAGGTAACAGTGTCTGTCAGGATGACAAATCCTGCGGCAAAGACAAAGA  
T

[0123] Nb2-Cys: (SEQ ID No:16)

[0124] CAGGTTTCAGTTGCAGGAATCGGGAGGTGGTAGTGTTCAGGCTGGCGGATCGCTGCGCCTTTCCTGCGCG  
GCCTCCGGGCCACGTATAGTTTCATATTTTCATGGCATGGTTCCGTCAGCCCCCGGTATGGAACGTGAAGGCGTGGC  
TGCAAGCAGTTACGACGGGAGCACGACATTGTATGCGGACTCAGTAAAGGGCCGCTTACCATTAGTCAAGGTAATG

CTAAGAACACAAAGTTCTTGTGTTGAATAATCTTGAGCCCCAAGATACGGCGATCTACTATTGTGCTTTACGCCGT  
CGTGGCTGGTCAAATACGTCGGGCTGGAAACAGCCAGGTTGGTACGACTATTGGGGTCAAGGCACGCAAGTAACCGT  
CAGTTCTAAGGATGACAAATCCTGCGGCAAAGACAAAGAT

[0125] NbGFPe-36linker-LaG16-Cys:(SEQ ID No:17)

[0126] CAGGTCCAACCTGGTTGAGTCTGGAGGGCGTTGGTGCAGCCCCGGTGGGAGCCTTCGTCTTTCTGTGCG  
GCCAGTGGATTCCCTGTAAACCGTTATAGTATGCGTTGGTATCGTCAAGCTCCTGGCAAAGAGCGTGAATGGGTGGC  
CGGAATGTCATCGGCCGGCGATCGCAGTAGTTACGAAGATTCGGTTAAAGGCCGTTTACCATTAGTCGTGACGACG  
CCCCTAACACGGTTTATCTGCAGATGAATAGTTTAAAACCTGAAGACACAGCAGTATATTATTGCAATGTAAACGTA  
GGATTGCAATATTGGGGTACAGGTACACAGGTAACAGTGTGTCAGGCGGTAGTGCTGCTTCCGGTGGAGCATCAGC  
TAGTGGAGGTACGGGCGGATCCGGAGGGACTTCGGCTTCCGGTGTCTTGCCGGCGGATCCGGTGGAGCTGGTACTC  
AGGTGCAACTTGTGAAAGTGGAGGGCGTCTGTGCAAGCGGGTGATAGTTTACGTCTTAGTTGTGCCGCTAGCGGG  
CGCACATTCAGTACATCTGCTATGGCTTGGTTTCGTCAAGCACCAGGCCGTGAGCGCGAGTTCGTGGCGGCTATCAC  
GTGGACTGTGGTAATACTATCTTAGGAGACAGCGTTAAGGGCCGCTTACCATCAGTCGTGACCGCGCCAAAATA  
CAGTAGATCTGCAGATGGACAATTTGGAGCCTGAGGATACAGCTGTATATTATTGTAGCGCACGTAGCCGTGGCTAC  
GTTCTGTCTGTTCTGCGCTCTGTCGACTCTTATGATTATTGGGGTCAAGGCACGCAAGTGACTGTGTCTAGCAAGGA  
TGACAAATCCTGCGGCAAAGACAAAGAT

[0127] 步骤三:将上述步骤二中序列构建到pET26b表达载体中,然后转化至大肠杆菌 Rosetta(DE3)中进行诱导表达蛋白,纯化获得目的蛋白。

[0128] 具体的构建-转化-诱导表达的操作过程为:

[0129] (1)合成基因片段后将其连接到pET26b表达载体上,所形成连接产物带有卡那霉素(kanamycin)抗性;

[0130] (2)将连接产物转化到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞并涂布在具有卡那霉素(kanamycin)抗性固体LB平板上,倒置于37 $^{\circ}$ C培养箱中培养12~14h;

[0131] (3)对固体LB平板上的单菌落进行挑选并送测序公司测序,待测序结果出来后与设计序列进行比对测序结果是否正确;

[0132] (4)将测序正确的质粒转化到大肠杆菌Rosetta(DE3)感受态细胞并涂布在具有卡那霉素抗性固体LB平板上,倒置于37 $^{\circ}$ C培养箱培养12~14h;

[0133] (5)挑选步骤(4)中平板上的单菌落接种到50mL的含有卡那霉素抗性的LB液体培养基中,置于37 $^{\circ}$ C恒温摇床中220rpm培养12~14h,

[0134] (6)将步骤(5)中的含菌培养基转移到2L的含有2 $\times$ YT(Formedium)液体培养基中摇晃培养扩增,直到OD<sub>600</sub>约0.8时,待其冷却加入IPTG使其终浓度0.5mM,于22 $^{\circ}$ C条件下220rpm诱导16小时;

[0135] (7)以8000rpm离心20分钟,收集菌体;

[0136] (8)以渗透冲击破碎法裂解细菌,从而释放蛋白,利用组氨酸标签技术和亲和色谱纯化方法,实现嵌合体纳米抗体的初步纯化;

[0137] (9)进一步的将步骤(8)中得到的抗体产物利用分子筛色谱技术实现进一步纯化;

[0138] 实施例2:嵌合体纳米抗体的位点特异性修饰

[0139] 如图2中所示,对上述实施例1中所得到的嵌合体纳米抗体进行位点特异性修饰。

[0140] 具体实验过程如下:

[0141] (1) 将上述实施例1中所得到的嵌合体纳米抗体以超滤管置换到含有还原剂的磷酸缓冲液中( $1 \times \text{PBS} + 1\text{mM EDTA} + 3\text{mM TCEP}$ ),  $4^\circ\text{C}$ 反应30min;

[0142] (2) 将步骤(1)中的已还原的嵌合体纳米抗体的缓冲液置换为pH为6.8的磷酸盐缓冲液PB(PB: $8.1\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $1.5\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $137\text{mM NaCl}$ ,  $2.7\text{mM KCl}$ ,  $\text{pH} = 6.8$ ), 然后加入交联试剂DBC0-PEG4-Maleimide, 以纳米抗体和交联剂的摩尔比例为1:20的条件在 $4^\circ\text{C}$ 反应2小时;

[0143] (3) 利用7K脱盐柱除去上述步骤(2)中的交联剂, 然后用10K超滤管置换缓冲液为pH为7.4的 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液, 最后以嵌合体纳米抗体和Azide-DNA ( $5' - 3' : \text{CCTTCAACATATCCTCTAC-Azide}$ , SEQ ID No:7)的摩尔比例为1:10的条件在 $4^\circ\text{C}$ 反应过夜;

[0144] (4) 最后利用分子筛SEC和离子交换技术IEX纯化得到高纯度的修饰有DNA的嵌合体纳米抗体探针。然后利用SDS-PAGE电泳技术验证纯化得到的峰确实是目标产品, 详细的表征结果见图3。详细分析如下: 反应混合物(MIX)在纯化前对应泳道A, 经分子筛SEC纯化出现两个峰, 第一个峰(SEC图上的P3, P4, P5)对应SDS-PAGE泳道B、C和D, 第二个峰(SEC图上的P7)对应泳道E, E泳道没有条带但是在分子筛图谱上有高强度的信号值, 结果充分展示: 经SEC纯化过程, 去除了大量未反应的DNA, 但是第一个峰所对应的B、C和D条带显示有较高比例未成功修饰上DNA的嵌合体纳米抗体, 因此, 进一步的利用离子交换技术IEX进行纯化, 泳道G是未修饰的嵌合体纳米抗体作对照, 泳道H是上一步SEC中第一个峰的稀释样(显得杂蛋白不明显), IEX的第一个峰(IEX图上的4)对应泳道I, 第二个峰(IEX图上的14和15)对应泳道J和K, 条带J和K的显示所收集到的产品是含有高比例的修饰上DNA的嵌合体纳米抗体, 说明进一步纯化效果明显。

[0145] 实施例3: 单分子定位超分辨成像

[0146] 对上述实施例2中所得到的嵌合体纳米抗体探针应用到细胞内各种细胞器标记上, 接下来分别以内质网和核孔复合物的标记为例进行详细阐述。

[0147] (1) 内质网标记

[0148] 将所培养的COS-7细胞接种到细胞爬片上, 待密度长到约70%时, 采用瞬时转染方法将质粒mEmerald-sec61b转染到细胞中, 细胞过表达能够与所纯化的纳米抗体相结合的绿色荧光蛋白标签mEmerald, 转染效率约有70%, 然后由工作浓度3%多聚甲醛(PFA)和0.1%戊二醛(GA)的混合固定液将细胞固定15min, 去掉固定液, 以 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液清洗细胞三次, 然后室温封闭通透处理细胞1小时, 最后将实施例2中的嵌合体纳米抗体探针加入到细胞中于 $4^\circ\text{C}$ 孵育过夜,  $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液清洗3次后, 加入带有荧光染料的DNA成像链PS1 (Cy3B-AGAAGTAATGTGGAA-BHQ2, SEQ ID No:10)进行单分子定位超分辨成像。

[0149] 基于以上步骤使用NbGFPe-LaG16-Cys-DNA进行单分子定位超分辨成像得到了NbGFPe-LaG16-Cys-DNA的内质网超分辨成像图。

[0150] 结果如图4, 比较两种嵌合体纳米抗体的内质网超分辨成像图, 发现NbGFPe-Nb2-Cys-DNA探针的效果明显优于NbGFPe-LaG16-Cys-DNA。

[0151] (2) 核孔复合物标记

[0152] 将所培养的U-2OS Nup96-mEGFP细胞接种到细胞爬片上, 待48小时后, 以预热的2.4% PFA溶液固定30min, 去掉固定液, 以 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液清洗细胞三次, 然后以封闭通透试剂(3%BSA@0.25%Triton X-100@ $1 \times \text{PBS}$ )室温处理2小时, 最后将实施例2中的嵌合体纳米

抗体探针加入到细胞中于4℃孵育过夜,1×PBS缓冲液清洗3次后,加入带有荧光染料的DNA成像链PS1进行单分子定位超分辨成像。

[0153] 基于以上步骤分别使用NbGFPe-Cys-DNA、Nb2-Cys-DNA以及两个单纳米抗体联合(NbGFPe-Cys-DNA+Nb2-Cys-DNA)进行了单分子定位超分辨成像。

[0154] 结果如图5,比较单纳米抗体和嵌合体纳米抗体的超分辨成像图,发现嵌合体纳米抗体NbGFPe-Nb2-Cys-DNA探针的效果明显优于NbGFPe-Cys-DNA和Nb2-Cys-DNA,同时也优于两个单纳米抗体联合(NbGFPe-Cys-DNA+Nb2-Cys-DNA)使用。

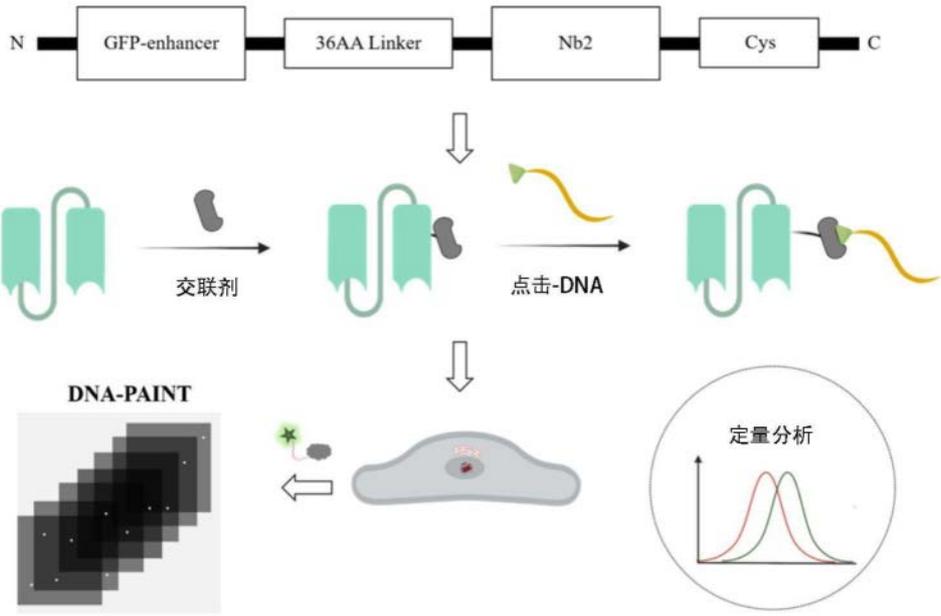


图1



图2

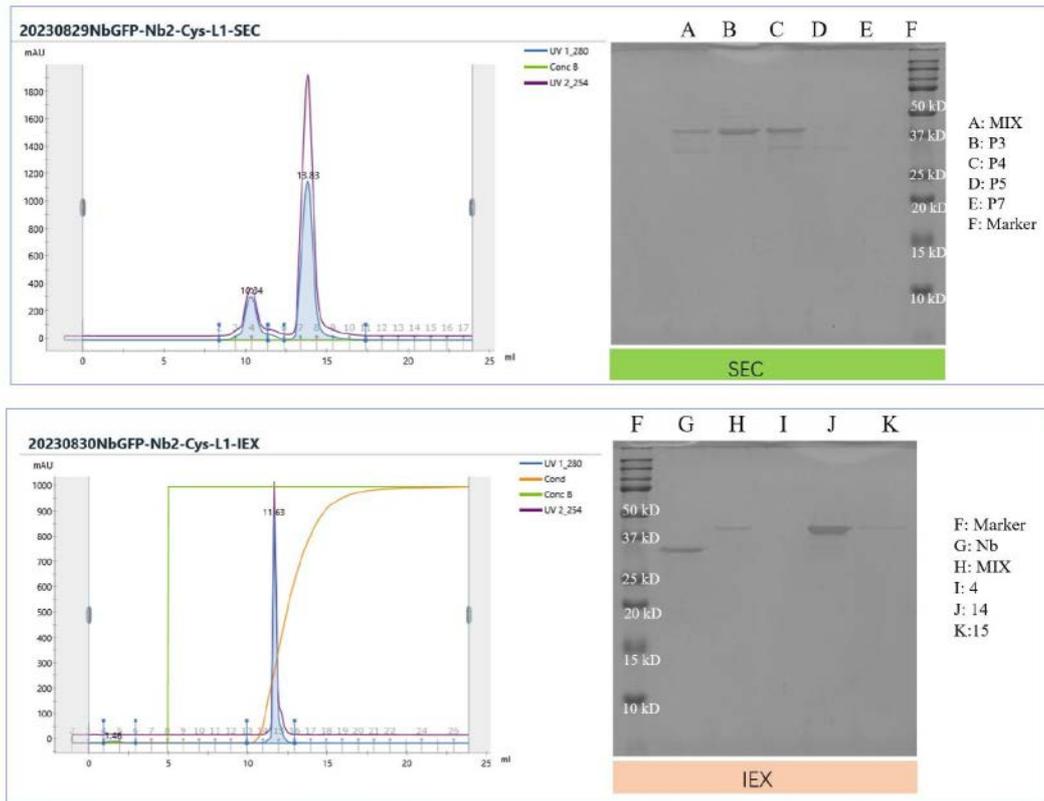


图3

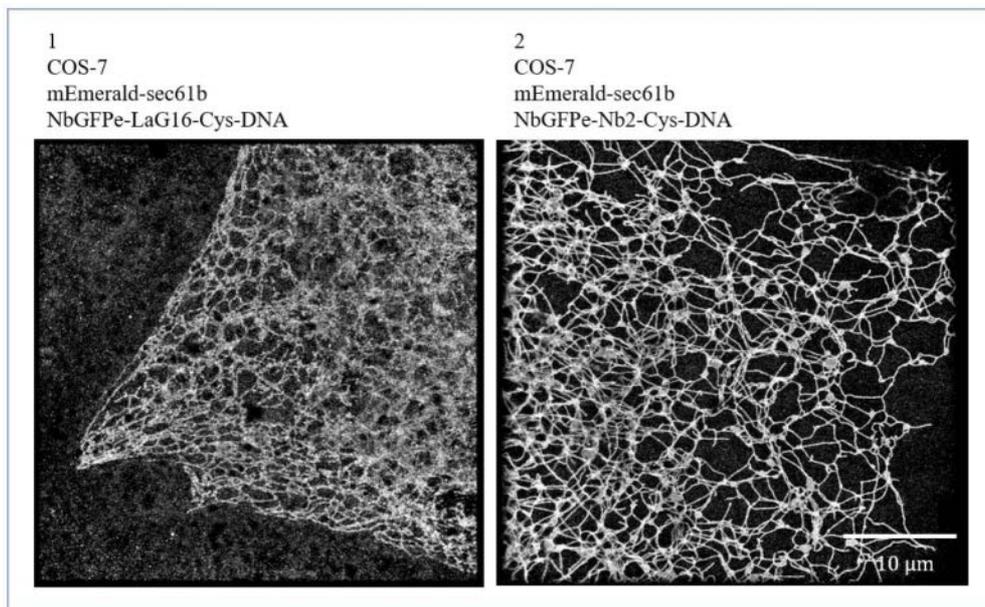


图4

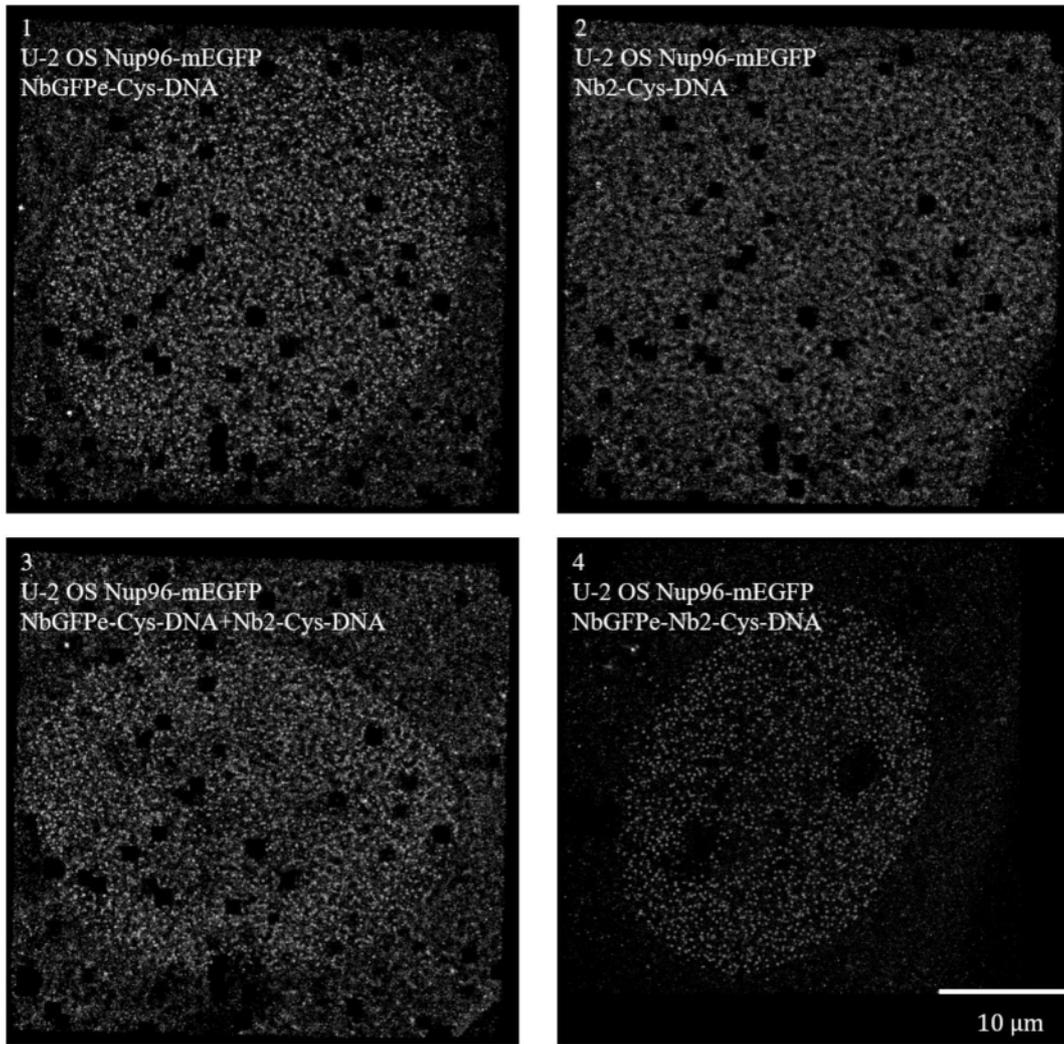


图5