



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104812773 B

(45)授权公告日 2018.04.06

(21)申请号 201380038741.2

(22)申请日 2013.06.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104812773 A

(43)申请公布日 2015.07.29

(30)优先权数据
10-2012-0079615 2012.07.20 KR
10-2012-0124733 2012.11.06 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.01.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2013/005433 2013.06.20

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/014207 EN 2014.01.23

(83)生物保藏信息
KCTC12283BP 2012.09.24

(73)专利权人 庆熙大学校产学协力团
地址 韩国京畿道龙仁市
专利权人 明知大学校产学协力团

(72)发明人 夫盛熙 韩胎龙 金兑林 徐胄源
梁胜焕

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332
代理人 吕琳 刘明海

(51)Int.Cl.
C07K 16/12(2006.01)
C12N 5/12(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

(56)对比文件
CN 101035809 A, 2007.09.12,
US 2004224320 A1, 2004.11.11, (续)
审查员 贾麒

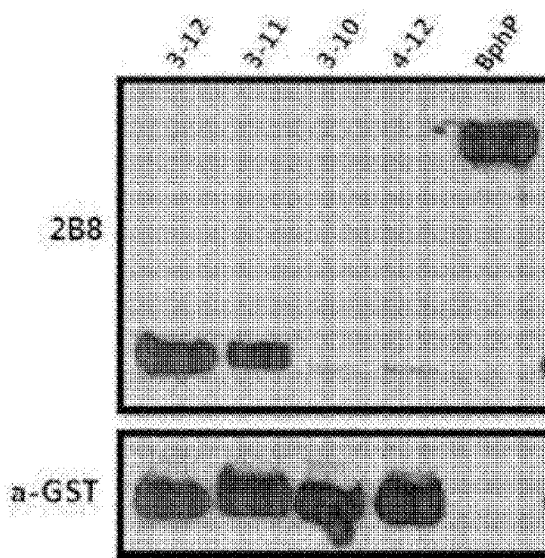
(54)发明名称

表位标记用抗体、杂交瘤细胞株以及其用途

(57)摘要

本发明涉及一种源自耐辐射球菌(Deinococcus radiodurans)的感光蛋白质的细菌光敏色素(Bacteriophytochrome, BphP)的肽标签,能够特异地识别上述肽标签的抗体,能够产生上述抗体的杂交瘤细胞株和它们的用途。根据本发明的新型肽标签具有短的长度的同时,具有能够消除现有的c-myc标签及FLAG标签等的非特异性反应的优点。因此,利用根据本发明的新型肽标签及其对应的抗体时,能够非常有效地检测或者纯化重组细胞内表达的融合蛋白质。并且,包括根据本发明的新型肽标签及与其对应的抗体的表位标记系统可以适用于特定蛋白质的细胞内定位,功能鉴定,检测,纯化,以及研究蛋

白质间的相互作用等的各种领域中。



[接上页]

(56)对比文件

WO 2009015163 A1, 2009.01.29,
Tae-Lim Kim等.《Production of
Bacteriophytochrome Specific Antibodies

of *Deinococcus radiodurans*》.《Journal
Applied Biological Chemistry》.2010, 第53卷
(第2期), 第112-115页.

1. 一种由SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽标签在检测或纯化融合蛋白质的用途,

其中所述融合蛋白包括目的蛋白以及与所述目的蛋白连接的由SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽标签,

并且,所述检测或纯化是通过对应于所述肽标签的抗体实现的。

2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,

所述抗体为单克隆抗体。

3. 根据权利要求2所述的用途,其特征在于,

所述单克隆抗体由保藏号为KCTC12283BP的杂交瘤细胞株所产生。

4. 根据权利要求2所述的用途,其特征在于,

所述单克隆抗体的重链同种型为IgG 2a。

5. 根据权利要求2所述的用途,其特征在于,

所述单克隆抗体的轻链同种型为 κ (kappa)。

表位标记用抗体、杂交瘤细胞株以及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于目的蛋白质的检测或纯化的表位(epitope)标记系统,更详细的说,涉及一种源自作为耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)的感光蛋白质(photoreceptor protein)的细菌光敏色素(Bacteriophytochrome, BphP)的新型肽标签,以及能够特异地识别上述肽标签的抗体及能够产生上述抗体的杂交瘤细胞株。并且,本发明还涉及编码上述肽标签的多核苷酸;涉及包括上述多核苷酸的载体或转化体;以及包括上述肽标签的融合蛋白质及用于制备、检测或纯化上述融合蛋白质的方法和试剂盒。

背景技术

[0002] 有用的蛋白质或多肽可通过合成产生或者可以从天然供给源中分离。但是,这种方法存在在费用、时间方面并不经济,且生产量有限的缺点。因此,优选通过对重组制备的转化体进行培养而生产目的蛋白质和目的多肽,其中上述重组是为使目的蛋白质或目的多肽过表达而进行的。但是,在细胞环境中产生的多肽(特别是短的多肽)由于存在于细胞的蛋白酶的作用而易降解(degradation),而且,并不是所有目的蛋白质都有抗体,因此不易纯化没有对应抗体的目的蛋白质。

[0003] 为了克服这些问题使用了蛋白质标记或表位标记。蛋白质标记(protein tagging)或者表位标记(epitope tagging)是制备将表位标记的编码序列连接于目的蛋白质的编码序列的重组核酸分子后,使其在合适的宿主细胞中表达,再利用对应于表位标记的抗体对目的蛋白质进行检测、定量、纯化或在目的蛋白质的细胞内追踪位置,功能鉴定等的一种重组DNA方法。商业上有很多表位标签和作为其相应配体的抗体,当选择合适抗体的表位标签和其对应的抗体时,能够使用蛋白质印迹分析(Western blot analysis),免疫沉淀(immunoprecipitation),免疫荧光(immunofluorescence),免疫细胞化学(immunocytochemistry),免疫亲和纯化(immunoaffinity purification)等方法对目的蛋白质进行检测或纯化,因此可以消除对目的蛋白质产生抗体的必要性。

[0004] 目前使用于蛋白质标记(protein tagging)或者表位标记(epitope tagging)的表位标签有从六个氨基酸残基程度的短肽标签(例如,6×组氨酸(Histidine, His)标签)至40kDa程度大的蛋白质(例如,MBP)的很多独特的标记[参见Stevens, R.C., (2000) Structure Fold Des 8:R177-85],而一般会使用由3至30个氨基酸构成的肽标签。His-标记的蛋白质在Ni-NTA(镍-次氨基三乙酸)的树脂上被特异性地捕获,且其可以通过EDTA或咪唑被洗脱下来。除此之外,麦芽糖结合蛋白质(MBP)(396个氨基酸,40kDa)、金黄色葡萄球菌蛋白质A、钙调蛋白质结合肽(CBP)(26个氨基酸,2.96kDa)、绿色荧光蛋白质(Green Fluorescent Protein, GFP)(238个氨基酸,27kDa)及谷胱甘肽-S-转移酶(GST)(211个氨基酸,26kDa)也可用于原核生物及真核生物蛋白质的检测或纯化。并且,通常最常用的表位标签有c-myc标签,HA标签,FLAG标签等。c-myc标签是源于人的c-myc蛋白质的长度为10个氨基酸的表位标签[Evans et al., (1985) Mol. Cell. Biol., 12:3610-3616],HA标签是源自流感病毒血凝素(influenza hemagglutinin)HA-1蛋白质的长度为9个氨基酸的表位标签

[Field et al., (1988) Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165], FLAG标签是源自噬菌体T7的长度为8个氨基酸的表位标签[Hopp et al., (1988) Bio/Technology, 6:1204-1210]。

[0005] 另外,对于进行表位标记时所使用的表位标签,应优选使用当其与目的蛋白质融合时,对目的蛋白质的三维结构和生物活性影响最小的表位标签。一般长度长的表位标签(例如GST标签或者MBP标签)会存在改变目的蛋白质的功能等的问题。相反,长度相对较短的表位标签,例如,FLAG标签、c-myc标签等,几乎不影响与其融合的目的蛋白质的特性,且能够与其对应的抗体高度特异地结合,并且,有些时候不需要从融合蛋白质中去除,因此是现在主要使用的表位标签。但是,对于c-myc标签和FLAG标签的氨基酸序列,迄今为止已知的生物体的细胞内的蛋白质中大多数的蛋白质含有相同的序列,从而可能会诱导识别标签的抗体的非特异性反应,而这种非特异性抗体反应会妨碍对特定目的蛋白质的分离及确认,因此存在会降低试验的可靠性的问题[Ksenija Gasic et al., (2005) Plant molecular biology reporter 23:9-16]。为了克服这种非特异性反应的问题,曾开发过在蛋白质的N-末端连续融合两个不同的标签后使用的亲和纯化系统[Rigaut, G., et al. (1999) Nat Biotechnol 17:1030-2]。

[0006] 因此,需要开发一种新型肽标签以及可与其配对使用的抗体。上述新型肽标签以及可与其配对使用的抗体可以克服现有技术中利用表位标签及其对应的抗体对在重组宿主细胞内表达的融合蛋白质进行检测及纯化时存在的问题,即可以克服非特异性反应,同时具有较短的氨基酸序列。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题

[0008] 本发明的所要解决的一个技术问题在于,提供一种对检测或者纯化目的蛋白质有效的新型肽标签,以及其用途。

[0009] 本发明所要解决的另一个技术问题在于,提供一种能够特异地识别新型肽标签或能够与新型肽标签选择性结合的新型抗体,能够产生上述抗体的杂交瘤细胞株及其用途。

[0010] 技术方案

[0011] 本发明的发明人在为了开发对目的蛋白质的检测或者纯化有用的肽标签及相对应抗体而进行研究的过程中,使用耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)的感光蛋白质细菌光敏色素(Bacteriophytochrome, BphP)或者其片段作为免疫原,获得产生单克隆抗体的杂交瘤,其中上述耐辐射球菌为异养细菌。同时,利用产生的抗体,以耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)的细菌光敏色素(Bacteriophytochrome, BphP)为对象进行了表位鉴定(epitope mapping),发现了由9个氨基酸构成的表位,从而完成了本发明。

[0012] 为解决上述一个目的,本发明提供一种肽标签,其包含由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的肽或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽,作为抗体的识别部位或抗体的结合部位。另外,本发明提供一种编码上述肽标签的多核苷酸。此时,编码上述肽标签的多核苷酸优选包括SEQ ID NO:7的碱基序列或者SEQ ID NO:8的碱基序列。另外,编码上述肽标签的多核苷酸可通过具有SEQ ID NO:16的碱基序列的正向引物和具有SEQ ID NO:17的碱基序列的反向引物构成的引物对,或者由具有SEQ ID NO:32的碱基序列的正向引物和具有SEQ ID NO:33的碱基序列的反向引物构成的引物对合成。此外,本发明提供含有编码上述

肽标签的多核苷酸的重组载体。此时,上述重组载体可以是克隆载体或者表达载体。另外,上述表达载体其特征在于,优选可还包括编码目的蛋白质的目的多核苷酸,上述目的多核苷酸与编码肽标签的多核苷酸连接。此外,本发明提供包含目的蛋白质及与其连接的肽标签的融合蛋白质。此时,构成上述融合蛋白质的肽标签包含由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的肽或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽,作为抗体的识别部位或者抗体的结合部位。另外,本发明提供一种编码上述融合蛋白质的多核苷酸。此外,本发明提供一种转化体,其特征在于,该转化体导入有选自编码上述肽标签的多核苷酸、包含编码上述肽标签的多核苷酸的重组载体、编码上述融合蛋白质的多核苷酸、以及包含编码上述融合蛋白质的多核苷酸的重组载体中的任意一种。并且,本发明提供一种融合蛋白质的检测方法,其包括:使上述融合蛋白质与对应于肽标签的抗体相接触并结合的步骤;以及确认结合于上述抗体的融合蛋白质的存在或对其量进行分析的步骤。此时,上述融合蛋白质可通过导入有编码融合蛋白质的多核苷酸或者包括其的重组载体的转化体进行表达。此外,上述抗体,其特征在于,其优选为由保藏号为KCTC 12283BP的杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体。此外,本发明提供一种蛋白质的纯化方法,其包括:使上述融合蛋白质与对应于肽标签的抗体接触并结合的步骤;以及回收结合于上述抗体的融合蛋白质的步骤。此时,上述融合蛋白质可通过导入有编码融合蛋白质的多核苷酸或者包括其的重组载体的转化体进行表达。此外,上述抗体,其特征在于,其优选为由保藏号为KCTC 12283BP的杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体。另外,本发明提供融合蛋白质检测或者纯化用试剂盒,其包括:选自编码上述肽标签的多核苷酸、用于合成编码上述肽标签的多核苷酸的引物对、包括编码上述肽标签的多核苷酸的重组载体、编码上述融合蛋白质的多核苷酸及包括编码上述融合蛋白质的多核苷酸的重组载体中的任意一个;以及选自能够与由SEQ ID NO:1氨基酸序列构成的肽或者由SEQ ID NO:2氨基酸序列构成的肽特异性结合的抗体,或者产生上述抗体的杂交瘤细胞株中的任意一个。此外,上述抗体,其特征在于,其优选为由保藏号为KCTC12283BP的杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体。

[0013] 为解决上述另一目的,本发明提供对应于由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的肽或者SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽的一种抗体。此时,上述抗体特征在于,其优选为单克隆抗体。此外,上述单克隆抗体特征在于,其为重链同种型(isotype) IgG 2a或者轻链同种型 κ (kappa)。此外,本发明提供产生上述抗体的杂交瘤细胞株。此时,上述杂交瘤细胞株特征在于,其保藏号为KCTC 12283BP。另外,本发明提供包括上述抗体或者上述杂交瘤细胞株的试剂盒。此时,上述抗体特征在于,其固定于支撑体(support)。此外,上述试剂盒优选可包括上述抗体(对应于由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的肽或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽的抗体)的检测手段。上述检测手段优选为二抗,该二抗能够与对应于由SEQ ID NO:1氨基酸序列构成的肽或者由SEQ ID NO:2氨基酸序列构成的肽的抗体结合。此外,上述二抗优选能够与选自酶、放射性物质或者荧光物质中的标记物质偶联(conjugate)。此外,上述试剂盒可以用于融合蛋白质的检测或者纯化,其中上述融合蛋白质包括目的蛋白质及与其连接的由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的肽或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽。

[0014] 有益效果

[0015] 根据本发明的新型肽标签具有短的长度的同时,具有能够消除现有的c-myc标签

及FLAG标签等的非特异性反应的优点。因此,利用根据本发明的新型肽标签及其对应的抗体时,能够非常有效地检测或者纯化重组细胞内表达的融合蛋白质。并且,包括根据本发明的新型肽标签及与其对应的抗体的表位标记系统可以适用于特定蛋白质的细胞内定位,功能鉴定,检测,纯化,以及研究蛋白质间的相互作用等的各种领域中。

附图说明

[0016] 图1是表示利用His标签柱层析法对DrBphP及DrBphN进行纯化的结果的附图。图1中的A是概略地表示用于表达耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的BphP蛋白质及BphN蛋白质的基因构建体的模式图(全长(FL) (1-755氨基酸,BphP); Δ PHY/HKD(1-321氨基酸,BphN))。图1中的B表示利用 Ni^{2+} -NTA亲和层析法对耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的BphP脱辅基蛋白质(Apoprotein)及BphN脱辅基蛋白质进行纯化,并与胆绿素(BV)一起培养20分钟后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),再通过锌(zinc)-荧光诱导方法检测BV结合的结果(右边);以及用考马斯亮蓝(Coomassie Blue)染色的结果(左边)(1:BphP粗提取物,2:纯化的BphP,3:BphN粗提取物,4:纯化的BphN)。纯化条件-结合和洗涤:pH值8.0、100mM的三羟甲基氨基甲烷(Tris),200mM氯化钠(NaCl),10mM咪唑/洗脱:pH值8.0、100mM的Tris,200mM氯化钠,150mM咪唑。

[0017] 图2是表示利用所选择的单克隆抗体,对已纯化的BphP及BphN进行蛋白质印迹分析(Western blot analysis)的结果的附图。对已纯化的BphP及BphN进行SDS-PAGE后,利用已纯化的BphP的单克隆抗体(2B8,2C11,3B2,3D2,3H7)进行蛋白质印迹分析(P:BphP,N:BphN)。通过蛋白质印迹分析确认了单克隆抗体中2B8抗体识别存在于蛋白质的N-末端的表位。

[0018] 图3表示确认Oat PhyA是否与BphP的五种单克隆抗体发生反应的结果。其中,该Oat PhyA是构成N-末端部位的PCD结构与DrBphP相类似的燕麦光敏色素蛋白质(Oat phytochrome protein)。

[0019] 图4表示通过蛋白质印迹分析的2B8抗体的一次表位鉴定的结果。在图4中“a-GST”表示抗-GST抗体。

[0020] 图5表示通过蛋白质印迹分析及考马斯亮蓝染色的2B8抗体的二次表位鉴定的结果。

[0021] 图6是表示能够将BRT标签连接于GST蛋白质N-末端的融合蛋白质在大肠杆菌中正常表达,且能够通过2B8抗体对融合蛋白质进行检测的蛋白质印迹分析结果。在图6中“a-myc”表示抗-myc抗体,“a-GST”表示抗-GST抗体。

[0022] 图7是表示能够将BRT标签连接于GFP的N-末端的融合蛋白质在植物细胞中正常表达,且能够通过2B8抗体对融合蛋白质进行检测的蛋白质印迹分析结果。在图7中“myc”表示抗-myc抗体。

[0023] 图8表示使用2B8抗体对多种细胞蛋白质进行蛋白质印迹分析的结果,以及对用于蛋白质印迹分析的细胞蛋白质样品进行考马斯亮蓝染色的结果。

[0024] 图9表示通过对转化细胞进行培养,使在DrBphN蛋白质(SEQ ID NO:6)中去除第1~11位的氨基酸的DrBphN变形蛋白质的C-末端分别结合BRT标签、Flag标签、His标签及Myc标签的融合蛋白质表达,并在提取总蛋白质后通过蛋白质印迹分析观察表达状态的结果,

以及对用于蛋白质印迹分析的各种融合蛋白质样品进行考马斯亮蓝染色的结果。

具体实施方式

[0025] 本发明一方面涉及一种新型肽标签,其可用于对目的蛋白质进行纯化或检测的表位标记系统。根据本发明的新型肽标签包括由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的肽或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽,以作为抗体的识别部位或者抗体的结合部位。本发明的说明书中的肽标签与蛋白质标签或者表位标签可以相互交换使用。本发明中的术语“肽标签”是指融合到目的蛋白质可以用作标签的肽。并且,本发明中的术语“表位”是指能够被特定抗体识别的抗原结合部位或者与B细胞或T细胞进行反应的抗原的一定部位。作为抗体的识别部位或者抗体的结合部位,根据本发明的肽标签包括由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的肽或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽时,其长度基本没有限制。例如:根据本发明的肽标签考虑到通常用于表位标签的氨基酸残基数时,优选为具有9至30个氨基酸残基的肽,更优选为由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的肽或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽。由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的肽或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽源自作为耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的感光蛋白质的细菌光敏色素 (Bacteriophytochrome, BphP)。详细而言,由上述SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的肽是由在作为耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的感光蛋白质的细菌光敏色素 (Bacteriophytochrome, BphP) 的所有氨基酸序列 (SEQ ID NO:3) 中,与以N-末端为基准的第3位至第11位相对应的氨基酸残基所构成的肽。并且,由上述SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽是由在作为耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的感光蛋白质的细菌光敏色素 (Bacteriophytochrome, BphP) 的所有氨基酸序列 (SEQ ID NO:3) 中,与以N-末端为基准的第3位至第11位相对应的氨基酸残基中,第8位对应的氨基酸残基苯丙氨酸被替换为丙氨酸的肽。

[0026] 根据本发明一实施例的由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的肽或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽通过以下方法确定:以耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的细菌光敏色素为免疫原,利用常用的方法筛选杂交瘤细胞株,并从上述杂交瘤细胞株得到纯化的抗体之后,利用上述抗体进行表位鉴定 (epitope mapping)。以下,对于耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的细菌光敏色素,将用“DrBphP”或者“BphP”来表示。耐辐射球菌是在极低温、干燥、低氧、强酸的环境条件下也能够生长的一种极端微生物。光敏色素是一种感光蛋白质,其能够吸收外部的光信号向下部传递信号。根据现有的理论被认为只在高等植物中存在,但是,最近在蓝藻细菌,变形菌,放线菌,真菌 (fungi) 等中也发现了多种类似于光敏色素的光感受器。尤其,在耐辐射球菌和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中发现的类似于光敏色素的光感受器被命名为BphP,其中,DrBphP由SEQ ID NO:3的氨基酸序列所表示的755个氨基酸构成 [Davis SJ, et al., (1999) *Science* 286, 2517-2520]。BphP的N-末端部位由与植物光敏色素相类似的结构构成,然而在C-末端部位存在与植物光敏色素不同的组氨酸激酶结构域 (HKD) [Karniol R, et al., (2005) *Photosynth Res* 392, 103-116; Giraud E et al., (2008) *Photosynth Res* 97, 141-153]。并且,DrBphP即使无其他因素的帮助,也可与胆绿素 (BV) 结合形成可逆的Pr/Pfr异形体 [Vierstra RD et al., (2000) *Semin Cell Dev Biol* 11, 511-521; Bhoo SH, et al., (2001) *Nature* 414, 776-779;

Rockwell NC, et al., (2006) *Annu Rev Plant Biol* 57, 837–858]。

[0027] 以下,对表位鉴定的步骤进行详细说明,其用于确认根据本发明的新型肽标签。首先,构建与耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的BphP整体长度相对应的基因 (SEQ ID NO:4),以及与以DrBphP的N-末端为基准的由1~321位的氨基酸构成的多肽 (SEQ ID NO:6; 以下称为BphN或者DrBphN) 相对应的基因 (SEQ ID NO:5) [参照图1中的 (A)],并将其插入于pET28a (+) 的载体之后,利用BL21感受态细胞进行表达。然后,利用pET28a (+) 的载体所包括的His标签,通过Ni²⁺-NTA亲和层析法 (QIAGEN) 进行蛋白质纯化。由于上述表达的BphP蛋白质 (SEQ ID NO:3) 和BphN蛋白质 (SEQ ID NO:6) 都包括对BV结合起到重要作用的PAS结构域和GAF结构域及Cys-24残基,因此其自身就能够与BV结合。为了确认BphP蛋白质和BphN蛋白质的表达以及纯化,向纯化的BphP蛋白质和BphN蛋白质添加BV,并在常温条件下进行10分钟的恒温处理之后,进行了SDS-PAGE,之后实施考马斯亮蓝染色和锌 (Zinc) 印迹试验的结果,可以确认BphP蛋白质和BphN蛋白质的表达及纯化 [参照图1中的 (B)]。接下来,为了制备对BphP的单克隆抗体,作为抗原,在6周大的雌性BALB/c小鼠的腹腔内将耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的BphP蛋白质或者BphN蛋白质与弗氏完全 (Complete Freund's) 佐剂混合注射,之后处死小鼠获得B淋巴细胞。此后,混合B淋巴细胞和骨髓瘤细胞,进行细胞融合后进行培养。之后,轮流更换HAT培养基和HT培养基,通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 确认了融合细胞的抗体生成,并总共筛选了24个杂交瘤细胞株候选克隆。利用作为抗原注射过的BphP蛋白质或者BphN蛋白质,对总共24个杂交瘤细胞株候选克隆进行融合平板ELISA (Fusion plate ELISA) 测试,确认了其结合程度 (表2)。其结果观察到2B8克隆和2C11克隆在耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的BphP蛋白质和BphN蛋白质中全部以较高数值显色,从而推测其能够识别BphP蛋白质的N-末端部位。但是,3B2克隆及3D2克隆在BphP蛋白质中显示高数值,而在BphN蛋白质中显示接近于0的数值,因此推测其能够识别BphP蛋白质的C-末端部位。与此不同地,3H7克隆在BphP蛋白质中显示高数值,而在BphN蛋白质中也显示一定的数值,从而推测其能够识别BphP蛋白质的C-末端侧之外,一定程度上还能够识别N-末端部位。此后,对上述5个杂交瘤细胞株克隆进行了一次克隆平板ELISA (primary cloning plate ELISA) 测试、二次克隆平板ELISA (secondary cloning plate ELISA),并最终通过产生腹水 (ascites) 进行了抗体的纯化。结果确保了5个单克隆抗体,其包括有2B8抗体、2C11抗体、3B2抗体、3D2抗体及3H7抗体。然后,为了确认已纯化的抗体对预表达及纯化的BphP蛋白质和BphN蛋白质是否也产生相同的结果,实施了蛋白质印迹分析 (Western blot)。对于5μg的纯化的BphP蛋白质和BphN蛋白质,作为一抗 (primary antibody) 使用相对于2%脱脂牛奶的比例为1:1000的单克隆抗体后,作为二抗使用了以1:10000的比例进行处理的辣根过氧化物酶 (HRP)-小鼠抗体 (SIGMA),实施了蛋白质印迹分析。其结果与对杂交瘤细胞株克隆进行的ELISA测试一样,获得了2B8抗体和2C11抗体可均结合于BphP蛋白质和BphN蛋白质两者的结果 (图2)。因此,能够想到上述2种抗体全部结合于BphP的N-末端部位。此外,3B2抗体及3D2抗体虽然对BphP蛋白质显示出了条带,但对BphN蛋白质未显示条带,从而能够得出其结合于BphP蛋白质的C-末端部位的结论。但是,对于3H7抗体,得出了与ELISA测试中的结果不相同的结果,即仅识别BphP蛋白质的结果。并且,观察各抗体的结合程度,结合于N-末端部位的2B8抗体及2C11抗体的结合最强,而认为能够识别C-末端部位的3D2抗体显示出与其相比较弱地识别的条带。接下来,从3H7抗体以及

3B2抗体依次显示出结合强度降低的条带。另外,DrBphP具有与植物光敏色素类似的结构,特别是构成N-末端部位的PCD在DrBphP和植物光敏色素中,均包括PAS结构域、GAF结构域、PHY结构域。确认了上述抗体是否与具有与DrBphP类似的结构燕麦(Oat)光敏色素蛋白质反应。然而,结果示出了对应于上述耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)的BphP蛋白质的5种单克隆抗体均不与燕麦光敏色素蛋白质(Oat PhyA)结合(图3)。因此,能够确认对于上述耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)的BphP蛋白质的单克隆抗体是BphP特异性的新型抗体,其能够识别与对于现有的Oat光敏色素蛋白质的抗体不同的表位。并且,本发明人通过分离上述抗体识别的表位,揭示了其能够使用为特异性的肽标签,其未包含于现有的已知生物体的任何蛋白质。具体而言,为了确认在对于上述耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)的BphP蛋白质的单克隆抗体中结合最强的2B8抗体的表位,制备重组部分肽(recombinant partial peptide),并实施了表位鉴定。制备分别包括DrBphP的所有氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的以N-末端为基准的3-12位的氨基酸序列(SEQ ID NO:13),3-11位的氨基酸序列(SEQ ID NO:1),3-10位的氨基酸序列,4-12位的氨基酸序列的肽片段,后通过蛋白质印迹分析确认了是否可以结合。其结果确认了如果有DrBphP的所有氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的与以N-末端为基准的3-11位相对应的9个氨基酸(SEQ ID NO:1),2B8抗体就能够正确地对其进行识别并结合。由此确认2B8抗体的表位是具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽。同时,也确认了可将其用作肽标签。并且,制备了SEQ ID NO:1的氨基酸序列中一个氨基酸残基被替换为丙氨酸的肽片段,并利用2B8抗体实施了表位鉴定。其结果确认了具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的肽也可作为2B8抗体的另一个表位来使用。

[0028] 并且,为了确保多种功能性,本发明的肽标签除了SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者SEQ ID NO:2的氨基酸序列之外,还可以提供为与公知的其它肽标签结合的形式。例如:本发明的肽标签为了提高目的蛋白质的检测能力、纯化能力、可溶性等,可以提供为在SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者SEQ ID NO:2的氨基酸序列上结合HA标签、FLAG标签、His标签、生物素羧基载体蛋白质(biotin carboxyl carrier protein,BCCP)或者麦芽糖结合蛋白质(maltose binding protein,MBP)的双重标签的形式(参照美国公开专利公报第20050221308号,美国公开专利公报第20060099710号,美国公开专利公报第6462254号)。并且,本发明的肽标签可以提供为在SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者SEQ ID NO:2的氨基酸序列上结合选自HA标签、6×His标签、c-myc标签及V5标签中的2个以上的标签的三重标签或者多重标签的形式(参照美国公开专利公报第20100184612号)。此外,本发明的肽标签可以提供为SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者SEQ ID NO:2的氨基酸序列反复的形式(例如,3×FLAG标签),或者在如上述的反复的氨基酸序列中一部分氨基酸残基被替换或缺失的形式(参照美国公开专利公报第7135624号)。

[0029] 根据本发明的肽标签含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者SEQ ID NO:2的氨基酸序列时,能够利用与其对应的抗体。例如:对应于含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者SEQ ID NO:2的氨基酸序列的肽标签的抗体有上述的2B8抗体。另外,根据本发明的肽标签的均等范围可以包括构成SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者SEQ ID NO:2的氨基酸序列的一部分氨基酸被个别取代、缺失、添加或者变形的同时,对2B8抗体的结合活性保持在规定水平的变异体(변이체),例如:以原来结合活性为基准至少保持75%以上的变异体等。上述氨基酸的替换优选通过不改变肽的特性的保守氨基酸替换(conservative amino acid

replacement) 来实现。并且,上述氨基酸的变形可以通过糖基化,乙酰化,磷酸化来实现。此外,根据本发明的肽标签可以包括标记的氨基酸。并且,根据本发明的肽标签可以包括通过氨基酸序列上的变异或者修饰,对热、pH等的结构稳定性增加或对抗体的活性增加的肽。例如:根据本发明的肽标签的变异体标签可以包括由SEQ ID NO:13的氨基酸序列构成的肽或者由SEQ ID NO:36的氨基酸构成的肽,以作为抗体的识别部位或者抗体的结合部位。上述SEQ ID NO:13的氨基酸序列所构成的肽是由在作为耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的感光蛋白质的细菌光敏色素 (Bacteriophytochrome, BphP) 的所有氨基酸序列 (SEQ ID NO:3) 中,与以N-末端为基准的第3位至第12位相对应的氨基酸残基所构成的肽。并且,上述SEQ ID NO:36的氨基酸序列所构成的肽是在作为耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的感光蛋白质的细菌光敏色素 (Bacteriophytochrome, BphP) 的所有氨基酸序列 (SEQ ID NO:3) 中的与以N-末端为基准的第3位至第11位相对应的氨基酸残基中,与第10位所对应的氨基酸残基,即脯氨酸替换为丙氨酸的肽。

[0030] 本发明的另一方面涉及一种编码上述新型肽标签的多核苷酸及包括上述多核苷酸的重组载体。本发明中所使用的术语“多核苷酸”是指非变形 (non-modified) 或变形 (modified) 的所有多聚核糖核苷酸 (RNA) 或多聚脱氧核糖核苷酸 (DNA)。上述多核苷酸包括:单链或双链DNA;单链和双链区的混合物DNA;单链或双链RNA;单链和双链区的混合物RNA;含有单链或双链、或者单链和双链区的混合物DNA及RNA的杂交分子,但并不仅限于此。并且,本发明的多核苷酸包括合成上述的新型肽标签所使用的引物对,该引物对为单链的RNA或者DNA。此外,本发明的多核苷酸可以与核酸分子或寡核苷酸互换使用。

[0031] 对肽进行编码的多核苷酸可以包括非翻译序列(例如,内含子),也可以不包括非翻译序列(例如,cDNA)。编码肽的信息通过使用密码子被具体化。典型地,氨基酸序列使用通用基因密码 (Universal gene code),通过多核苷酸进行编码。“密码子”表示在多肽链中确定氨基酸序列的核苷酸的三联体密码 (triplet)。大部分有机体制备蛋白质或者作为蛋白质前驱体的其多肽时,利用20个或者21个的氨基酸。DNA存在4个核苷酸,包括腺嘌呤 (A),鸟嘌呤 (G),胞嘧啶 (C) 和胸腺嘧啶 (T),因此存在能够编码20个氨基酸和终止信号的64个三联体密码。由于这种重复性,大部分的氨基酸能够通过1个以上的三联体密码进行编码。由此,在不影响被编码的多肽的氨基酸序列的基础上,可以允许核苷酸序列的不同,这被称为由“密码子简并性 (codon degeneracy)”引起的“沉默突变”。编码本发明的新型肽标签的多核苷酸的沉默突变包括在本发明的范围内。另外,具体化单一氨基酸的密码子不能以相同的频率来使用,各个有机体往往会对编码相同的氨基酸的数个密码子中一个表现出特定的“偏好 (codon-bias)”。编码区含有大量稀有密码子或者稀有密码子簇 (cluster) 时,可以通过利用基因的重组或者诱发突变消除稀有密码子,从而提高表达水平[参照J. Sambrook and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), at 15.12]。因此,“密码子选择”可以用于在所选择的宿主中优化表达。最优选密码子是从高度表达的基因中主要被发现的密码子。大肠杆菌 (*E. coli*) 中的“密码子偏好”可以参照以下文献:Königsberg, et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 80:687-91 (1983)。

[0032] 用化学方法合成制备核苷酸序列时,可利用本领域公知的合成法,例如文献 (Engels and Uhlmann, *Angew Chem IntEd Engl.*, 37:73-127, 1988) 中所记载的方法,例

如:三酯(triester),亚磷酸盐(phosphite),亚磷酰胺(phosphoramidite)及H-磷酸酯(H-phosphate)方法,PCR及其它自动引物方法(autoprimer method),在固体支撑体上的寡核苷酸合成法(oligonucleotide synthesis method)等。

[0033] 因此,编码本发明的新型肽标签的多核苷酸可以由多种碱基序列构成,例如:编码由SEQ ID NO:1的氨基酸序列形成的肽标签的多核苷酸,优选可以由SEQ ID NO:7的碱基序列构成;编码由SEQ ID NO:2的氨基酸序列形成的肽标签的多核苷酸,优选可以由SEQ ID NO:8的碱基序列构成。并且,用于合成编码本发明的肽标签的多核苷酸的引物对可以由具有SEQ ID NO:16的碱基序列的正向引物和具有SEQ ID NO:17的碱基序列的反向引物构成,或者也可以由具有SEQ ID NO:32的碱基序列的正向引物和具有SEQ ID NO:33的碱基序列的反向引物构成。

[0034] 并且,本发明提供包括编码新型肽标签的多核苷酸的重组载体。例如:根据本发明的重组载体可以包括由SEQ ID NO:7的碱基序列构成的多核苷酸或者由SEQ ID NO:8的碱基序列构成的多核苷酸。上述重组载体可以以将编码新型肽标签的多核苷酸使用公知的标准方法插入至克隆载体或表达载体内的形式提供。本发明中所使用的术语“载体”是指能够在宿主细胞中用于碱基克隆及/或者转移的任何媒介物(Vehicle)。本发明中的载体可以是使外源DNA片段复制的一种复制子(replicon)。所谓“复制子”是在生物体内通过用于DNA复制的自我单元发挥功能的,即能够通过自我调节实现复制的任何遗传单位,例如,质粒、噬菌体、粘粒,染色体,病毒。术语“载体”用于在试管内、生物体外或者生物体内,向宿主细胞导入碱基的病毒及非病毒的媒介物。术语“载体”还可以包括微球形DNA(miniglobular shape DNA)。例如,上述载体可以是不具有细菌DNA序列的质粒。消除CpG区域中丰富的细菌DNA序列是为了减少转基因表达沉默,同时也是为了能够从质粒DNA载体中实现更持续的表达。并且,术语“载体”可包括如睡美人(Sleeping Beauty)的转座子[Izsvak et al.J.Mol.Biol.302:93-102(2000)]或者人工染色体。本发明中所使用的术语“克隆载体”定义为能够向宿主细胞内搬运DNA片段,并能够将其再生的物质。本发明中的克隆载体还可包括多聚腺苷酸化信号(polyadenylation signal),转录终止序列(transcription termination sequence)和多克隆位点(multiple cloning site)。此时,上述多克隆位点(multiple cloning site)至少包括一个核酸内切酶(endonuclease)限制性酶切位点(restriction site)。并且,克隆载体还可包括启动子。作为一例,本发明中编码新型肽标签的多核苷酸可以位于多聚腺苷酸化信号(polyadenylation signal)及转录终止序列(transcription termination sequence)的上游(upstream),且至少一个核酸内切酶(endonuclease)限制性酶切位点(restriction site)可以位于多聚腺苷酸化信号(polyadenylation signal)及转录终止序列(transcription termination sequence)的上游。并且,本发明中所使用的术语“表达载体”定义为用于在合适的宿主内克隆的DNA进行转录和翻译时所需的DNA序列。并且,本发明中所使用的术语“表达载体”是指包括与插入物可操作的连接的必要的控制单元(control element)的基因构建体,其在个体的细胞内时,可使插入物表达。上述表达载体能够利用标准的重组DNA技术进行制备及纯化。对于上述表达载体的种类,只要能够发挥在原核细胞及真核细胞的各种宿主细胞中表达所需的基因,产生所需的蛋白质的功能,就没有特别的限制,但优选为保留有显示高活性的启动子和高表达能力的同时,能够大量产生与自然状态类似形状的外源蛋白质的载体。表达载体优选

至少包括启动子,起始密码子,编码所需蛋白质的基因,及终止密码子终止子。此外,也可以适当的包括编码信号肽的DNA,额外的表达控制序列,所需基因的5'侧及3'侧的非翻译区,选择标记区,或者可复制单元(replicable unit)等。“启动子”是指足以指导转录的最小序列。并且,还可包括足以表达可调节的启动子依赖性基因的启动子结构,其中上述启动子依赖性基因可由细胞类型特异性或者外部的信号或者制剂所诱导,而这些结构可位于基因的5'或者3'部位。根据本发明的表达载体可以包括保守性启动子及诱导型启动子两种。启动子序列可源自原核生物,真核生物或者病毒。术语“可操作地连接”是指通过单一多核苷酸上的多核苷酸序列的相关性,一种功能被其它功能所调节。例如,启动子可以控制编码序列的表达时(即编码序列在启动子的转录调节下时),启动子可与编码序列连接后操作,或者,如果当核糖体结合位点构成为能够促进翻译时,核糖体结合位点与编码序列连接后操作。编码序列能够在正义方向或者反义方向连接于控制序列后被操作。作为根据本发明的表达载体的优选的一例包括编码新型肽标签的多核苷酸,(例如,由SEQ ID NO:7的碱基序列构成的多核苷酸或者由SEQ ID NO:8的碱基序列构成的多核苷酸中任意一个)以及编码目的蛋白质的目的多核苷酸。

[0035] 本发明的又一方面涉及一种包括上述的新型肽标签的融合蛋白质。本发明中所使用的术语“融合蛋白质”是指呈不同功能的2种以上的肽,寡肽,多肽或蛋白质相互连接的形状的聚合物。本发明中的融合蛋白质可与融合多肽、融合寡肽、重组多肽、重组寡肽或者重组蛋白质互换使用。根据本发明的融合蛋白质的第一部分至少包括一种上述的新型肽标签,融合蛋白质的第二部分至少包括一种目的蛋白质。本发明中的目的蛋白质可与目的肽、目的寡肽或者目的多肽互换使用。根据本发明的融合蛋白质的新型肽标签连接于目的蛋白质的密码子区,因此能够利用对新型肽标签的抗体,有效地进行检测或纯化。根据本发明肽标签不仅可以位于目的蛋白质的C-末端,还可位于N-末端,或者不实质性地影响蛋白质的功能性的基础上,还可以插入于任何部位。其中,上述不实质性地影响蛋白质的功能性是指具有融合上述肽标签之前的蛋白质所具有的功能的80%,优选具有95%。本发明中使用的目的蛋白质可以为任意的蛋白质,例如,可以是对癌相关抗原TAG-72的人源化抗体AKA/HzK单链FV(ScFv),促血小板生成素(thrombopoietin,TP0),B-淋巴细胞刺激因子(B-lymphocyte stimulator)等。根据本发明的融合蛋白质包括2个以上的肽组合,例如包括肽标签及目的蛋白质的组合,且上述2个以上的肽可通过共价键或非共价键连接。此时,上述肽标签及目的蛋白质可在没有任何媒介物的情况下直接连接,也可通过如多肽接头(peptide linker)的媒介物间接连接。作为优选的一例,上述融合蛋白质包括至少一种可切割的多肽接头时,可通过化学及/或者酶对可切割的接头进行切割,从而从融合蛋白质回收目的蛋白质。并且,根据本发明的融合蛋白质可优选设计成包括一个以上的标签、可切割的多肽接头及目的蛋白质。接头在一般情况下,除了联合蛋白质或者维持蛋白质间的最小间距或其它空间关系之外,不具有特异的生物活性,但是对于构成多肽接头的氨基酸,也可以选择对分子的特性,例如,对折叠、净电荷、或疏水性产生一定影响的氨基酸。多肽接头可选择地包括用于分离融合的结构多肽的部位,例如,可以被蛋白水解酶切割的部位。可切割的多肽接头的长度可以是1个至约50个氨基酸,优选为1个至约20个氨基酸。通过酶可切割的多肽接头例如可包括胰凝乳蛋白酶-3切割序列;通过酸可切割的多肽接头例如可包括天冬氨酸-脯氨酸二肽(D-P)的结构部分。可以使用本领域中公知的许多技术将可切割的多肽接

头混入融合蛋白质中。并且,可以使用易弯曲(flexible)的多肽接头,还可以使用具有GGSGGT氨基酸序列、GGGGS氨基酸序列、GGGSGGGGS氨基酸序列的多肽接头,但对此并没有限制。多肽接头使得包括上述多肽接头的多核苷酸可操作的连接于编码融合蛋白质的各个肽的多核苷酸之间的框架(in frame)内,并可通过表达载体进行表达。

[0036] 用于制备本发明中的肽(肽标签、可切割的多肽接头、目的肽及/或者融合肽)的手段是本领域公知的技术(参照Stewart et al.,Solid Phase Peptide Synthesis,Pierce Chemical Co.,Rockford,IL,1984;Bodanszky,Principles of Peptide Synthesis,Springer-Verlag,New York,1984;及Pennington et al.,Peptide Synthesis Protocols,Humana Press,Totowa,NJ,1994)。本说明书所记载的融合肽的多种构成要素(肽标签、目的肽、及可切割的接头等/切割序列)是能够通过公知的化学合成方法制备的[参照Hermanson,Greg T.,Bioconjugate Techniques,Academic Press,New York (1996)],但是化学合成经常由于费用及/或者杂质的原因,被限制为制备长度小于约50个氨基酸的肽。本说明书所记载的肽优选可使用标准重组DNA及分子克隆技术来制备[参照Sambrook,J.et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Third Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY (2001);Silhavy,T.J.,et al.,Experiments with Gene Fusions,Cold Spring Harbor Laboratory Cold Press Spring Harbor,NY (1984);及Ausubel,F.M.et.al.,Short Protocols in Molecular Biology,5th Ed.Current Protocols and John Wiley and Sons,Inc.,N.Y.,2002]。

[0037] 本发明的另一方面涉及一种包括上述表达载体的转化体。本发明中所使用的术语“转化体”是指导入了具有编码一个以上的目的蛋白质的多核苷酸的表达载体,从而被转化的细胞。用于制备转化体的方法有瞬时转染(transient transfection)、显微注射、转导(transduction)、细胞融合、磷酸钙沉淀法、脂质体介导的转染(liposemmediated transfection)、DEAE-葡聚糖介导的转染(DEAE Dextran-mediated transfection)、聚凝胺介导的转染(polybrene-mediated transfection)、电穿孔法(electroporation)、电注射法(electroinjection)、聚乙二醇(PEG)等的化学处理方法,利用基因枪(gene gun)等的方法,但并不限于此。将导入上述表达载体的转化体在营养培养基中进行培养时,可大量生产融合蛋白质,且还可以进行分离。可以根据宿主细胞选择利用适当的培养基和培养条件。进行培养时,应适当地调节温度、培养基的pH及培养时间等条件,以便适合于细胞的生长和蛋白质的大量产生。能够用根据本发明的表达载体进行转化的宿主细胞只要是本领域公知的宿主细胞,则对其种类没有具体限制,例如可以为原核细胞、植物细胞、昆虫细胞、动物细胞等,通常优选使用DNA的导入效率高,且导入的DNA的表达效率高的宿主。例如,可以使用的宿主细胞有公知的如埃希氏菌(Escherichia)、假单胞菌、芽孢杆菌、链霉菌等的原核宿主,优选可以使用大肠杆菌。通过宿主细胞的蛋白质的表达可以使用诱导剂异丙基- β -D-半乳糖苷(isopropyl- β -D-galactopyranoside, IPTG)诱导表达,而诱导时间可以调节为使蛋白质的量最大化。本发明中通过重组产生的蛋白质可以从培养基或者细胞分解物中进行回收。当上述重组的蛋白质为膜结合型时,可以通过使用合适的表面活性剂溶液(例如,聚乙二醇辛基苯基醚(Trinton-X100))或者酶切,从膜中脱离下来。对蛋白质表达所使用的细胞可以通过如反复冻结-解冻,超声波处理、机械破碎或细胞分解剂等等多种物理或者化学手段进行破坏,并且可以通过通常的生化分离技术进行分离或纯化。

(Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, Vol. 182, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990)。例如, 对通过宿主细胞表达的蛋白质的分离或纯化方法包括: 电泳法、离心分离、凝胶过滤、沉淀、透析、层析(离子交换层析, 亲和层析, 免疫吸附亲和层析, 反相高效液相色谱(reverse phase HPLC), 凝胶渗透HPLC)、等电聚焦及其多种的变化或者复合方法, 但并不局限于此。另外, 包括根据本发明的肽标签的融合蛋白质优选可以利用免疫吸附亲和层析进行分离、纯化, 其中上述免疫吸附亲和层析使用了对应于上述肽标签的抗体。

[0038] 本发明的另一方面涉及一种对应于上述新型肽标签的抗体及能够产生这种抗体的杂交瘤细胞株。根据本发明的抗体是能够特异性识别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的肽或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽, 或者能够特异地或者选择性地与其结合的抗体。本发明中所使用的术语“抗体”是指在免疫系统内, 由特定抗原的刺激而产生的物质, 其能与上述特定抗原特异地结合, 从而发生抗原-抗体反应, 不仅包括在免疫系统内产生的天然形式, 还包括具有与天然形式的抗体相同的活性的抗体分子的功能性片段。上述天然形式的抗体的结构一般是具有2个轻链及2个重链的结构, 每个轻链和重链通过二硫键连接。抗体分子的功能性片段是指保留有抗原结合功能的片段, 其包括Fab、F(ab'), F(ab')₂和Fv等。抗体片段中Fab是具有轻链和重链的可变区, 以及轻链的恒定区及重链的第一恒定区(CH1)的结构, 因此具有1个抗原结合部位。Fab'与Fab的差异在于, 在重链CH1结构域的C末端具有包括一个以上的半胱氨酸残基的铰链区(hinge region)。F(ab')₂是通过Fab'的铰链区的半胱氨酸残基构成二硫键而产生。Fv只有重链可变部位及轻链可变部位的最小的抗体片段, 生成Fv片段的重组技术公开于国际公开专利WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086及WO 88/09344。双链Fv(dsFv)通过二硫键连接重链可变部位和轻链可变部位, 而单链Fv(scFv)一般是通过多肽接头使重链可变区和轻链可变区共价键连接。这种抗体片段可利用蛋白水解酶获得[例如, 对整个抗体用木瓜蛋白酶进行限制性切割时, 可以得到Fab; 而用胃蛋白酶切割时, 可以得到F(ab')₂片段], 优选可以使用基因重组技术制备。本发明要达到的目的是使上述抗体成为能够与本发明的肽标签特异结合的抗体, 优选可以是Fab形式或整个抗体形式, 更优选可以是单克隆抗体形式。并且, 本发明提供杂交瘤细胞株, 其可以产生对应于上述的新型肽标签的单克隆抗体。上述杂交瘤细胞株于2012年9月24日, 寄存在了韩国生命工学研究院生命资源中心(KCTC), 保藏号为KCTC12283BP。

[0039] 对本发明的新型肽标签具有特异结合性的单克隆抗体, 可以利用上述肽标签或者包括该肽标签的多肽作为免疫原而进行制备。更详细地说, 首先将作为免疫原的上述肽标签向除了人以外的哺乳动物的皮下、肌肉、静脉或者腹腔内进行1次或1次以上的注射, 从而使其免疫致敏。此时, 肽标签根据需要可以以与弗氏佐剂(Freund adjuvant)混合的形式使用。上述除了人以外的哺乳动物, 优选为小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、猫、狗、猪、山羊、绵羊、驴、马或牛等, 包括为了能产生其它动物衍生的抗体而进行一定操作的转基因(transgenic)动物, 例如, 产生人抗体的转基因(transgenic)小鼠。更优选为小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠或者兔。从第一次免疫开始约每隔1~21天实施1~4次免疫, 且最后免疫1~10天之后, 可从免疫致敏的哺乳动物中获得产生抗体的细胞。进行免疫的次数及时间间隔可以根

据使用的免疫原的特点进行适当地改变。分泌单克隆抗体的杂交瘤 (hybridoma) 的制备可以根据凯拉 (Kira) 及米尔施泰因 (milstein) 等的方法 (Nature, 1975, Vol. 256, p. 495-497), 以及与此对应的方法进行。从如上上述的被免疫致敏的除了人以外的动物中采集选自脾脏、淋巴结、骨髓和扁桃体的任意一种, 优选采集脾脏, 从而通过将包含于脾脏的产生抗体的细胞和源自哺乳动物的没有产生抗体的能力的骨髓瘤细胞 (myeloma cells) 进行细胞融合来制备杂交瘤细胞 (hybridoma cell)。上述细胞融合中所使用的骨髓瘤细胞 (myeloma cells) 可以使用小鼠来源的骨髓瘤 P3/X63-Ag8.653 (653), P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1), P3/X63-Ag8.U1 (P3U1), SP2/0-Ag14 (Sp2/0, Sp2), PAI, F0, 或 BW5147; 大鼠来源的骨髓瘤 210RCY3-Ag.2.3; 或人来源的骨髓瘤 U-266AR1, GM1500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, D1R11 或 CEM-T15。作为细胞融合的方法, 例如可为使用如聚乙二醇或仙台病毒等在内的融合促进剂的方法或者利用电脉冲 (electric pulse) 的方法。作为一例, 在含有融合促进剂的融合培养基中将抗体产生细胞和能够无限增殖的哺乳动物来源的细胞以约 1:1 至 1:10 的比例进行悬浮, 并以这种状态, 在约 30℃ 至 40℃ 的温度条件下培养约 1 分钟至 5 分钟。例如, 融合培养基可以使用如 MEM 培养基、RPMI 1640 培养基及 IMDM 培养基 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 等在内的常规培养基使较好, 优选不添加牛血清等的血清。筛选产生单克隆抗体的杂交瘤细胞克隆的方法是将获得的融合细胞转移至 HAT 培养基等选择培养基中, 在约 30℃ 至 40℃ 的温度条件下培养约 3 天至 3 周, 从而使杂交瘤细胞以外的其它细胞死亡。接着, 在微量滴定板 (microtiter plate) 等中培养杂交瘤细胞, 之后通过如放射免疫分析 (radioactive substance-marked immuno antibody, RIA) 或者 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 等的免疫分析方法对用于上述的人除外的动物的免疫反应的免疫原和培养上清液的反应性进行确认, 并筛选反应性增加的杂交瘤细胞。筛选出的产生上述单克隆抗体的杂交瘤细胞克隆显示出对上述免疫原的特异性结合力。本发明的单克隆抗体杂交瘤细胞株可通过在生物体内外进行培养而获得。培养可使用用于培养哺乳动物来源的细胞的常规方法, 并且, 为了能够从培养物等中采集单克隆抗体, 可使用本领域中用于纯化一般抗体的常规的方法。用于纯化抗体的方法例可以有盐析、透析, 过滤, 浓缩, 离心分离, 分步沉淀 (fractional precipitation), 凝胶过滤层析, 离子交换层析, 亲和层析, 高效液相色谱, 凝胶电泳及等电点电泳等, 这些可根据需要而进行组合后应用。此后, 纯化后的单克隆抗体根据用途的不同而通过浓缩、干燥, 以液相或者固相进行保存。并且, 本发明的单克隆抗体可通过以下方法制备: 通过 PCR 法或者化学合成法对分别将编码重链及轻链可变区的 DNA 与已知的 DNA (例如, 日本公开专利公报第 2007-252372 号) 连接的基因进行合成, 并将合成的基因导入至公知的表达载体 (例如, pcDNA3.1 (Invitrogen 公司出售)) 等之后, 利用上述表达载体制备转化体, 之后通过培养实现转化的 CHO 细胞或大肠杆菌等宿主细胞而使其表达, 并从这些培养液中利用蛋白质 A (Protein A) 柱等对表达的抗体进行纯化。

[0040] 本发明的另一方面涉及上述新型肽标签、编码上述肽标签的多核苷酸或者对应于上述肽标签的抗体等的用途。

[0041] 例如, 本发明的一例提供上述融合蛋白质的制备方法。根据本发明的一例的融合蛋白质的制备方法包括: 对导入编码融合蛋白质的多核苷酸的转化体进行培养, 以表达融合蛋白质的步骤。此时, 编码上述融合蛋白质的多核苷酸, 优选以包含于重组载体形式导入至转化体中。并且, 上述重组载体包括: 编码上述肽标签的多核苷酸和编码与上述肽标签连

接的目的蛋白质的多核苷酸。其中,上述2个多核苷酸优选通过多肽接头的序列连接,其中上述多肽接头包括能够被蛋白质分解酶等切割的部位。

[0042] 并且,本发明的一例是提供上述的融合蛋白质的检测方法。根据本发明的一例的融合蛋白质的检测方法包括:将连接肽标签及目的蛋白质的融合蛋白质与对应于上述肽标签的抗体接触而使其结合的步骤;以及确认结合于上述抗体的融合蛋白质的存在或对其量进行分析的步骤。此时,根据本发明的一例的融合蛋白质的检测方法,具体可以使用蛋白质印迹分析法、ELISA法(Enzyme-linked immunosorbent assay)、免疫沉淀法(immunoprecipitation)、免疫荧光法(immunofluorescence)、免疫细胞化学法(immunocytochemistry)或者蛋白质微阵列法等方法。其中,蛋白质微阵列法是在玻璃基板或硅基板上固定对应于本发明的肽标签的特异性抗体,可以用于大规模样品的分析。

[0043] 并且,本发明的一例为提供上述融合蛋白质的纯化方法。根据本发明的一例的融合蛋白质的纯化方法包括:将连接肽标签及目的蛋白质的融合蛋白质与对应于上述肽标签的抗体接触而使其结合的步骤;以及回收结合于上述抗体的融合蛋白质的步骤。其中,抗体固定于支撑体,优选固定于固体支撑体上。用于固定抗体的支撑体的一例有柱(column),珠(bead),吸附剂,硝酸纤维素膜等,可通过公知的多种的固定方法,将抗体固定于支撑体上。根据本发明的融合蛋白质的纯化方法的具体例包括:使含有标记的蛋白质的样品接触(contact)于固定有抗体的支撑体上的过程。其中,上述标记的蛋白质是指目的蛋白质通过共价键连接于肽标签的蛋白质,上述肽标签对抗体具有特异性地结合活性,而上述接触是在抗体结合于肽标签的条件下进行的。之后,根据本发明的融合蛋白质的纯化方法可以包括:去除未结合于上述抗体的成份的过程;以及从支撑体中分离标记的蛋白质的过程。此时,支撑体及在固定于支撑体的抗体可用作免疫亲和层析的介质。以上述介质填充(pack)的柱(column)能够用于免疫亲和柱层析。如果使用本发明的纯化方法,可以得到高纯度的融合蛋白质,且包含于融合蛋白质的目的蛋白质可以维持固有的功能。

[0044] 并且,本发明的一例是提供融合蛋白质的表达、检测或者纯化用试剂盒。根据本发明的融合蛋白质的表达、检测或者纯化用试剂盒包括选自新型肽标签、编码上述新型肽标签的多核苷酸、用于合成上述多核苷酸的引物对、包括多核苷酸的重组载体以及由上述多核苷酸或者重组载体转化的转化体的任意一种。并且,根据本发明的融合蛋白质的表达、检测或者纯化用试剂盒可以包括选自对应于上述新型肽标签的抗体或者产生上述抗体的杂交瘤细胞株中择的任意一种。此外,根据本发明的融合蛋白质的表达用试剂盒优选包括重组载体,该重组载体包括编码本发明的新型肽标签的多核苷酸。并且,根据本发明的融合蛋白质的检测或者纯化用试剂盒优选包括对应于本发明的新型肽标签的抗体。此时,构成上述试剂盒的重组载体优选为包括编码融合蛋白质的多核苷酸的表达蛋白质,或者以使用者能够易于制备表达蛋白质的形式提供。上述融合蛋白质是肽标签和目的蛋白质连接在一起的多肽。并且,构成上述试剂盒的抗体优选以固定于合适的支撑体上的形式提供。此外,融合蛋白质检测用试剂盒优选还包括能够检测对应于肽标签的抗体的手段。此时,能够检测本发明抗体的手段优选是二抗。并且,构成上述融合蛋白质检测用试剂盒的本发明的抗体或者二抗优选通过酶、放射性物质、荧光物质等标记物质进行标记,其中,优选的标记方法是接合(conjugation)。此外,融合蛋白质纯化用试剂盒还可以包括用于分离肽标签的蛋白质分解酶。同时,根据本发明的试剂盒还可以包括说明书、限制性内切酶、连接酶、缓冲液

等。

[0045] 以下,将通过本发明的实施例进行更加详细的说明。但下述实施例只是为了清楚地说明本发明的技术特征而例示的,并不限制本发明的保护范围。

[0046] 实施例1:耐辐射球菌 (Deinococcus radiodurans) 的BphP基因及BphN基因的克隆

[0047] 通过PCR法,对编码耐辐射球菌 (Deinococcus radiodurans) 的细菌光敏色素 (BphP) 整体长度的基因 (SEQ ID NO:4) 和编码以DrBphP的N-末端为基准的第1~321位的氨基酸构成的多肽 (BphN) 的基因 (SEQ ID NO:5) 进行了克隆。具体而言,以编码耐辐射球菌 (Deinococcus radiodurans) 的细菌光敏色素蛋白质 (BphP) 的整体长度的基因 (SEQ ID NO:4) 为模板,利用用于克隆BphP基因的引物或者用于克隆BphN基因的引物,以及Ex-Taq (TAKARA) 聚合酶,进行约30个循环的PCR,从而获得扩增的BphP DNA产物及BphN DNA产物。以下表1显示了为获得BphP DNA产物及BphN DNA产物所使用的引物。在以下表1中出现的引物及后述的所有引物均由韩国柏业公司 (Bioneer co. (KR)) 所制备。

[0048] 表1

[0049]

SEQ ID NO	引物种类	碱基序列 (5'→3')	包含于引物的限制性内切酶识别部位
9	BphP 克隆用 正向引物	GCCATATGATGAGCCGGGACCCGTTG CCC	Nde I
10	BphP 克隆用 反向引物	GCCTCGAGTCAGGCATCGGCGGCTCC CGG	Xho I
11	BphN 克隆用 正向引物	GCCATATGATGAGCCGGGACCCGTTG CCC	Nde I
12	BphN 克隆用 反向引物	GCCTCGAGCGCTTCCTTGACCTGAAC TTG	Xho I

[0050] 扩增的PCR产物在1%的琼脂糖凝胶 (agarose gel) (QA-Agarose gel TM, Q-BIO, CAT#AGAHO250) 中进行电泳 (running), 并通过紫外线照射器确认了扩增的DNA大小。然后, 从胶 (gel) 上切割相当于DNA扩增产物条带 (band), 利用凝胶洗脱试剂盒 (gel elution kit) (FavorPrep GEL/PCR purification mini kit, FAVORGEN, CAT#FAGCK001-1) 分离出所需的DNA之后, 结合于Easy T-载体 (普洛麦格, promega), 并委托韩国柏业公司测定碱基序列。其结果确认了通过PCR生成的DNA产物具有所需的目标碱基序列BphP DNA与BphN DNA。

[0051] 之后, 利用限制性内切酶Nde I和Xho I, 将扩增的BphP DNA产物与BphN DNA产物分别插入于pET28a (+) 载体 (制造商: Novagen), 在42℃条件下对大肠杆菌BL21感受态细胞 (制造商: RBC, Taipei, Taiwan) 进行1分钟的热冲击 (heat shock), 使其转化。之后, 将其在包含卡那霉素的LB培养基中进行培养, 从而表达了BphP蛋白质和BphN蛋白质。

[0052] 实施例2:耐辐射球菌 (Deinococcus radiodurans) 的BphP蛋白质和BphN蛋白质的表达

[0053] 将转化的BL21感受态细胞在LB培养基上培养后,将生长的菌落(colony)接种在包含卡那霉素的LB培养基中,后在37℃条件下进行了约8个小时的种菌培养(seed culture)。将经过种菌培养的细胞接种在包含卡那霉素的LB培养基中,培养至OD₆₀₀值达到0.6的浓度之后,添加IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside)使其终浓度达到0.5mM,之后在25℃条件下进行了6小时的蛋白质诱导表达。接着,进行细胞离心分离,除去上层液,再用结合缓冲液(100mM Tris-Cl,150mM NaCl,及10mM咪唑,pH 8.0)使细胞团(pellet)重悬。然后对重悬的细胞团进行超声处理破碎细胞,再次进行离心分离后,只分离上层液之后,利用Ni⁺-NTA柱(QIAGEN)纯化了蛋白质。之后,在-70℃条件下保管纯化的蛋白质。

[0054] BphP蛋白质与BphN蛋白质都包括了对BV结合起到重要作用的PAS和GAF结构域及Cys-24残基,因此其自身也能够与BV进行结合。为获得holo-BphP蛋白质(holo-BphP protein),在纯化的Apo-BphP蛋白质(Apo-BphP protein)和Apo-BphN蛋白质(Apo-BphN protein)中添加胆绿素(BV,2μg/ml,Frontier,Scientific,Carnforth,UK),使其在室温条件下反应了10分钟。之后,对反应样品实施SDS-PAGE,然后使其在醋酸锌(zinc acetate)溶液(20mM zinc acetate,150mM Tris-Cl,pH 7.0)中反应20分钟,接着在紫外线(Ultraviolet,UV)下观察蛋白质的荧光信号。此外,对反应样品进行SDS-PAGE后,还实施了考马斯亮蓝染色。图1的(B)中的左侧显示考马斯亮蓝染色结果,右侧显示zinc印迹(blots)结果。如图1(B)所示,可以确认BphP蛋白质与BphN蛋白质的表达及纯化过程顺利实现。

[0055] 实施例3:能够与耐辐射球菌(Deinococcus radiodurans)的BphP蛋白质及BphN蛋白质特异结合的单克隆抗体的制备

[0056] 3-1:免疫处理

[0057] 以纯化的BphP蛋白质或者BphN蛋白质作为抗原,混合弗氏完全佐剂(com plete Freund's adjuvant)后,注射至6周大的雌性BALB/c小鼠腹腔内。浸液(Im mersion)用涡旋混合器(vortexer)混合1小时后,以同样的方法与Incomplete Fr eund's adjuvant与抗原混合,并注射至腹腔内。2周以后,从小鼠的尾部采血进行E LISA测试,抗体的滴度(antibody titer)处于1/1000至1.0以上时,将其用于细胞融合。在为了细胞融合的进行二次免疫处理后的第4周,用PBS稀释同量的抗原注射至腹腔内。3天后处死小鼠进行细胞融合。

[0058] 3-2:用于产生单克隆抗体的细胞融合

[0059] 为了制备B淋巴细胞源,切开腹部,使脂肪或其他脏器最大限度地分离,并在避免出血过多的基础上,无菌摘取脾脏,用细胞过滤网(strainer)进行均质化后,利用基本培养基进行稀释,反复进行2次离心分离并洗涤。将B淋巴细胞和骨髓瘤细胞以适当比例混合后,进行5分钟的离心分离,去除上层液。之后,轻轻摇晃剩余部分的细胞混合物,加入10ml预热的红细胞裂解缓冲液(RBC lysis buffer)使其混悬,之后在37℃条件下培养20分钟,接着加入胎牛血清(FBS)进行离心分离。细胞融合按照如下方法进行:首先,在维持37℃的条件下,在已离心分离的细胞混合物中缓慢添加聚乙二醇(polyethlyene glycerol,PEG)1500溶液,然后再次添加基本培养基使其停止反应。然后,迅速进行离心分离,除去上层液,将剩余的细胞混合物小心地,在小噬细胞培养基(microphage medium)中进行混悬,之后分开种至96孔(well)组织培养板,在二氧化碳恒温培养器中,以37℃条件进行培养。

[0060] 3-3:融合细胞的选择

[0061] 实施细胞融合的5天后,将作为融合细胞的选择培养基的HAT培养基添加至各个孔。之后,每间隔3天以同样的方法添加HAT培养基,细胞融合11天后更换成HT培养基,其中该HT培养基是在完全培养基中添加了HT添加剂而制备的。之后,每天用显微镜进行观察,确认融合细胞的生长程度。提取已确认生长的孔中的上层液,通过ELISA确认抗体的生成情况。对将判断为能够分泌所需抗体的融合细胞株用限制性稀释法(restriction dilution method)进行一次、二次、三次克隆,使融合细胞成为均源自同一个细胞株的克隆。

[0062] 3-4:通过ELISA的融合细胞选择

[0063] 在为了确认是否对免疫的抗原具有免疫性,以及为了制备单克隆抗体而进行的细胞融合之后,为筛选融合细胞,在96孔组织培养板添加用ELISA包被缓冲液稀释的抗原蛋白质溶液,并在4℃条件下使其反应。之后,吸去抗原蛋白质溶液,在各孔的剩余表面添加封闭缓冲液,在37℃条件下反应1小时。之后,除去封闭缓冲液,利用PBST溶液洗涤3次。将融合细胞培养上层液添加至各孔,在37℃条件下使其反应,之后除去溶液,再用PBST溶液洗涤3次。将用PBS稀释的辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase,HRP)偶联的抗小鼠免疫球蛋白(anti-mouse IgG)(Horseradish peroxidase conjugated anti-mouse immunoglobulin)溶液添加至各孔。邻苯二胺磷酸盐(orthophenylenediamine dihydrochloride,OPD)基质溶液添加至孔中,在常温下反应10分钟,之后用终止溶液使反应停止。此时,为确认反应后的显色程度,用ELISA酶标仪(ELISA reader)在492nm处测定吸光度,并以测定结果为基础,选择出了共24个候选的杂交瘤细胞株克隆。

[0064] 3-5:通过融合平板ELISA测试实现的与抗原的结合程度的再次确认及抗体的纯化

[0065] 对于共24个候选杂交瘤细胞株克隆,利用作为抗原而注射的BphP蛋白质BphN蛋白质来实施了融合平板ELISA(Fusion plate ELISA)测试,从而确认了其结合程度,在下面的表2中示出了其结果。如表2所示,2B8克隆与2C11克隆在耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)的BphP蛋白质与BphN蛋白质中都以高数值显色,因此可推测其识别BphP蛋白质的N-末端部位。然而,3B2克隆及3D2克隆在BphP蛋白质中显示出高数值,而在BphN蛋白质中显示出的数值接近于0,因此可推测其识别BphP蛋白质的C-末端部位。与此不同,3H7克隆在BphP蛋白质中显示出高数值,同时在BphN蛋白质中显示出一定程度的低值,因此可推测其除了识别BphP蛋白质的C-末端外,还可一定程度上识别N-末端部位。

[0066] 表2

[0067]

杂交瘤细胞株克隆	与抗原蛋白质的结合程度(在492nm处的吸光度)	
	BphN	BphP(完整(full))
1B6	0.0660	1.3190
1B11	0.1560	2.3700
1D6	0.0550	2.3180
2B8	2.3400	2.4200
2C11	2.3480	2.4040

[0068]

2D9	0.1430	2.2730
2E3	2.1720	1.8020
2F7	0.1220	2.4430
2H8	0.0650	1.3440
3A4	1.9180	2.3770
3B2	0.0980	2.2900
3B3	0.0700	2.1650
3C11	1.9730	2.2590
3D2	0.0640	2.2830
3D10	0.1180	2.4280
3D11	1.6850	2.3130
3F10	0.0730	2.3570
3G2	0.0880	2.0510
3G9	0.0800	1.5580
3H1	1.7840	2.0950
3H7	0.4640	2.3490
4B7	1.9730	2.2620
4E2	0.2050	2.3770
4E3	0.0550	2.2650

[0069] 之后,对于上述5个杂交瘤细胞株克隆实施了一次cloning plate ELISA测试,二次cloning plate ELISA测试,最终生成腹水(ascites),并进行抗体的纯化。其结果确保了5个单克隆抗体2B8抗体,2C11抗体,3B2抗体,3D2抗体及3H7抗体。抗体的纯化按照以下方法实施:向大于8周的BALB/c小鼠腹腔内注射0.5ml的姥蛟烷(pristane),1周至10天后培养出杂交瘤细胞,用PBS洗涤3次,并用PBS稀释至浓度为 5×10^6 cell/0.5ml后,使用注射器注射至腹腔内。1周至10天后观察腹水的肿胀后,颈椎脱臼处死小鼠,并在腹部开一个小孔,注意防止腹水流出的同时,利用血清分离管采集腹水。在室温条件下放置约1小时,并通过离心分离除去红细胞(RBC)。在采集的腹水中加入适量的PBS后,在4℃条件下与硫酸铵(ammonium sulfate)缓慢进行混合。接着,在4℃条件下进行离心分离后通过了过滤器。适量加入的与Protein A和DFMF混合的珠(beads)后,使用珠的10倍体积的Tris缓冲溶液进行洗涤。加入抗体后与protein A/G很好地混合后获得片段(fraction),用Tris缓冲溶液洗涤后,加入甘氨酸(glycine),分多次反复进行洗脱(elution)。将经上述纯化的抗体放入透析

袋(dialysis bag)中,在PBS缓冲溶液中透析3个小时,并重新更换PBS缓冲溶液,透析过夜,结束透析后的抗体定量后进行保管。

[0070] 实施例4:单克隆抗体的特异性分析

[0071] 为确认上述确保的抗体是否也对预表达(pre-expressed)及纯化的BphP蛋白质与BphN蛋白质显示同样的结果,实施了蛋白质印迹分析(Western blot)。对于纯化的BphP蛋白质和BphN蛋白质5 μ g,将相对于2%脱脂牛奶的比例为1:1000的浓度为1mg/ml的各个单克隆抗体作为一抗使用后,作为二抗使用了以1:10000的比例进行处理的HRP-小鼠抗体(SIGMA),从而实施了蛋白质印迹分析。其结果与对杂交瘤细胞株克隆进行的ELISA测试一样,获得了2B8抗体和2C11抗体可均结合于BphP蛋白质和BphN蛋白质两者的结果(图2)。因此,能够想到上述2种抗体全部结合于BphP的N-末端部位。此外,3B2抗体及3D2抗体虽然对BphP蛋白质显示出了条带,但对BphN蛋白质未显示条带,从而能够得出其结合于BphP蛋白质的C-末端部位的结论。但是,对于3H7抗体,得出了与ELISA测试中的结果不相同的结果,即仅识别BphP蛋白质的结果。并且,观察各抗体的结合程度,结合于N-末端部位的2B8抗体及2C11抗体的结合最强,而被认为能够识别C-末端部位的3D2抗体显示出与其相比较弱地识别的条带。接下来,从3H7抗体以及3B2抗体依次显示出结合强度降低的条带。

[0072] 另外,DrBphP具有与植物光敏色素类似的结构,特别是构成N-末端部位的PCD在DrBphP和植物光敏色素中,均包括PAS结构域、GAF结构域、PHY结构域,因此确认了上述抗体是否与燕麦(Oat)光敏色素蛋白质反应。然而,结果示出了对于上述耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)的BphP蛋白质的5种单克隆抗体均不与燕麦光敏色素蛋白质(Oat PhyA)结合(图3)。因此,能够确认对于上述耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)的BphP蛋白质的单克隆抗体是BphP特异性的新型抗体,其能够识别与对于现有的Oat光敏色素蛋白质的抗体不同的表位。

[0073] 本发明人于2012年9月24日,将对应于耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)的BphP蛋白质的单克隆抗体中结合程度最强的2B8抗体的杂交瘤细胞株2B8委托给了韩国生命工学研究院的生命资源中心(KCTC)进行保藏。杂交瘤细胞株2B8的保藏号为KCTC 12283BP。此外,2B8抗体的同种型(isotype)是通过利用小鼠抗体的ELISA方法所决定。2B8抗体的重链同种型(isotype)为IgG 2a,轻链同种型(isotype)为 κ (kappa)。

[0074] 实施例5:用于确认2B8单克隆抗体表位的表位鉴定

[0075] 5-1:一次表位鉴定

[0076] 为确定对应于上述耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)BphP蛋白质的单克隆抗体中结合程度最强的2B8抗体的表位,制备DrBphP重组部分肽(recombinant partial peptide),并实施了表位鉴定。

[0077] 首先,为了克隆DrBphP的全部氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的编码以N-末端为基准的第3-12位的氨基酸序列(SEQ ID NO:13)的DNA,编码第3-11位的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)的DNA,编码第3-10位的氨基酸序列的DNA,编码第4-12位的氨基酸序列的DNA,分别制备了对应的引物。利用制备的引物及PrimeSTAR HS(TAKARA,R040)聚合酶,进行30次循环的PCR,获得扩增的DNA产物。用于上述DNA克隆的PCR反应不需要额外的模板,在进行PCR的一次循环时,通过正向引物(Forward Primer)和反向引物(Reverse primer)的结合,可得到用于扩增的模板。以下表3示出了为了得到编码上述4个DrBphP重组部分肽(recombinant

partial peptide)的DNA扩增产物,而进行PCR时所使用的引物。

[0078] 表3

[0079]

SEQ ID NO	引物种类	碱基序列 (5'→3')	包含于引物的限制性内切酶识别部位
14	BphP 3-12 a.a. 克隆用正向引物	GC CTCGAG GGATCC ATG CGGGACCCGTTGCCCTTTTTT	BamH I
15	BphP 3-12 a.a. 克隆用反向引物	GC GAGCTC GAATTC TCA AAGCGGTGGAAAAAAGGGCAA	EcoR I
16	BphP 3-11 a.a. 克隆用正向引物	GC CTCGAG GGATCC ATG CGGGACCCGTTGCCCTTTTTT	BamH I

[0080]

17	BphP 3-11 a.a. 克隆用反向引物	GC GAGCTC GAATTC TCA CGGTGGAAAAAAGGGCAACGG	EcoR I
18	BphP 3-10 a.a. 克隆用正向引物	GC CTCGAG GGATCC ATG CGGGACCCGTTGCCCTTTTTT	BamH I
19	BphP 3-10 a.a. 克隆用反向引物	GC GAGCTC GAATTC TCA TGGAAAAAAGGGCAACGGGTC	EcoR I
20	BphP 4-12 a.a. 克隆用正向引物	GC CTCGAG GGATCC ATG GACCCGTTGCCCTTTTTTCCA	BamH I
21	BphP 4-12 a.a. 克隆用反向引物	GC GAGCTC GAATTC TCA AAGCGGTGGAAAAAAGGGCAA	EcoR I

[0081] 扩增的PCR产物在1%的琼脂糖凝胶 (agarose gel) (QA-Agarose gel TM,Q-BIO, CAT#AGAH0250) 中进行电泳 (running), 并通过紫外线照射器确认了扩增的DNA大小。然后, 从胶 (gel) 上切割相当于DNA扩增产物条带 (band), 利用凝胶洗脱试剂盒 (gel elution kit) (FavorPrep GEL/PCR purification mini kit,FAVORGEN,CAT#FAGCK001-1) 分离出所需的DNA之后, 将其结合 (ligation) 于pJET (CloneJET PCR cloning kit,Fermentas,# K1232) 载体。之后, 在10~20μl程度的结合载体添加30~50μl程度的大肠杆菌DH5α感受态细胞 (制造商:Invitrogen), 在冰上培养20分钟后, 在42℃条件下进行1分钟的热冲击 (heat shock), 接着再次在冰上恢复20分钟。之后, 在包含氨苄青霉素的LB培养基平板铺展 (spreading) 后, 在37℃条件下孵育 (incubation) 培养过夜, 以便完成转化。菌落 (colony) 长成后, 接种至包含氨苄青霉素的LB培养基, 并在37℃条件下培养过夜, 从而使细胞生长, 接着用质粒提取试剂盒 (FavorPrep Plasmid Extraction kit,FAVORGEN,cat#FAPDE300)

提取了质粒。然后,将提取出的质粒(plasmid)委托给韩国柏业公司测定了碱基序列。其结果确认了通过PCR生成的DNA产物具有所需的目标碱基序列。

[0082] 此外,利用限制性内切酶BamHI与EcoRI,剪切提取出的质粒及自身具有GST标签的pGEX4T1载体((GE Healthcare,Piscataway,NJ,USA)后,分别将在作为目的DNA的DrBphP的全部氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的编码以N-末端为基准的第3-12位的氨基酸序列(SEQ ID NO:13)的DNA,编码第3-11位的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)的DNA,编码第3-10位的氨基酸序列的DNA,编码第4-12位的氨基酸序列的DNA,结合(ligation)于蛋白质表达载体pGEX4T1载体。接着,用包括目的DNA的pGEX4T1载体对大肠杆菌BL21感受态细胞(制造商:RBC,Taipei,Taiwan)进行转化后,在包含氨苄青霉素的LB培养基上进行培养,诱导蛋白质表达。然后,利用超声处理对培养出的细胞进行破碎,通过离心分离仅分离出上层液后,利用GST树脂(Glutathion SepharoseTM High Performance,GE Healthcare)纯化蛋白质。对于纯化的蛋白质及耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*) BphP蛋白质进行了蛋白质印迹分析。此时,作为一抗使用2B8单克隆抗体及抗-GST抗体,作为二抗使用辣根过氧化物酶(HRP)偶联的抗小鼠免疫球蛋白(anti-mouse IgG;Sigma)。并且,在SDS-PAGE后,为了对转移至纤维素膜的样品进行显色,使用了阿莫仙电化学发光免疫印迹检测试剂(AmershamTM ECLTM Western Blotting Detection Reagents)(GE Healthcare,RPN21060L/AF)。图4是通过蛋白质印迹分析显示出了对于2B8抗体一次表位鉴定结果。如图4所示,2B8抗体的表位为DrBphP整个氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的以N-末端为基准的第3-11位的9个氨基酸(SEQ ID NO:1),从而确认了其可以使用为肽标签。并且,将由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的肽标签命名为“BRT标签”。

[0083] 5-2:二次表位鉴定

[0084] 通过上述一次表位鉴定,确认了由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的BRT标签为2B8抗体的表位。为确认构成BRT标签的氨基酸残基中,与2B8抗体的结合时起到重要作用的氨基酸残基,本发明人们制备了SEQ ID NO:1的氨基酸残基中的一个氨基酸被替换为丙氨酸的DrBph部分改进肽(modified partial peptide)。之后,为确认2B8抗体是否也识别上述DrBph部分改进肽(modified partial peptide),实施了二次表位鉴定。

[0085] 首先,为了对编码包含DrBphP整个氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的以N-末端为基准的第3-11位的氨基酸序列的同时,第3个氨基酸残基精氨酸被替换为丙氨酸的肽(用R3A表示)的DNA;编码包含DrBphP整个氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的以N-末端为基准的第3-11位的氨基酸序列的同时,第4个氨基酸残基天冬氨酸被替换为丙氨酸的肽(用D4A表示)的DNA;编码包含DrBphP整个氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的以N-末端为基准的第3-11位的氨基酸序列的同时,第5个氨基酸残基脯氨酸被替换为丙氨酸的肽(用P5A表示)的DNA;编码包含DrBphP整个氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的以N-末端为基准的第3-11位的氨基酸序列的同时,第6个氨基酸残基亮氨酸被替换为丙氨酸的肽(用L6A表示)的DNA;编码包含DrBphP整个氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的以N-末端为基准的第3-11位的氨基酸序列的同时,第7个氨基酸残基脯氨酸被替换为丙氨酸的肽(用P7A表示)的DNA;编码包含DrBphP整个氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的以N-末端为基准的第3-11位的氨基酸序列的同时,第8个氨基酸残基苯丙氨酸被替换为丙氨酸的肽(用F8A表示,SEQ ID NO:2)的DNA;编码包含DrBphP整个氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的以N-末端为基准的第3-11位的氨基酸序列的同时,第9个氨基酸

残基苯丙氨酸被替换为丙氨酸的肽(用F9A表示)的DNA;编码包含DrBphP整个氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的以N-末端为基准的第3-11位的氨基酸序列的同时,第10个氨基酸残基脯氨酸被替换为丙氨酸的肽(用P10A表示,SEQ ID NO:36)的DNA;以及编码包含DrBphP整个氨基酸序列(SEQ ID NO:3)中的以N-末端为基准的第3-11位的氨基酸序列的同时,第11个氨基酸残基脯氨酸被替换为丙氨酸的肽(用P11A表示)的DNA进行克隆,制备了分别与各个DNA对应的引物。利用制备的引物及PrimeSTAR HS(TAKARA,R040)聚合酶,进行约30个循环的PCR,从而获得了扩增的DNA产物。用于上述DNA克隆的PCR反应不需要额外的模板,在进行PCR的一次循环时,通过正向引物(Forward Primer)和反向引物(Reverse primer)的结合,可得到用于扩增的模板。以下表4示出了为获得编码上述9个DrBphP部分改进肽(modified partial peptide)的DNA扩增产物,而进行PCR时所使用的引物。由于通过PCR得到DNA扩增产物之后的过程,与一次表位鉴定相同,因此将省略对其的说明。

[0086] 表4

[0087]

SEQ ID NO	引物种类	碱基序列 (5'→3')	包含于引物的限制性内 切酶识别部位
22	R3A 克隆用 正向引物	GC GGATCC ATG GCCGACCCGTTGCCCTTTTTCACCG	BamH I
23	R3A 克隆用 反向引物	GC GAATTC TCA CGGTGGAAAAAAGGGCAACGGGTCGGC	EcoR I
24	D4A 克隆用 正向引物	GC GGATCC ATG CGGGCCCCGTTGCCCTTTTTCACCG	BamH I

[0088]

25	D4A 克隆用 反向引物	GC GAATTC TCA CGGTGGAAAAAAGGGCAACGGGGCCCG	EcoR I
26	P5A 克隆用 正向引物	GC GGATCC ATG CGGGACGCCTTGCCCTTTTTTCCACCG	BamH I
27	P5A 克隆用 反向引物	GC GAATTC TCA CGGTGGAAAAAAGGGCAAGGCGTCCCG	EcoR I
28	L6A 克隆用 正向引物	GC GGATCC ATG CGGGACCCGGCCCCCTTTTTTCCACCG	BamH I
29	L6A 克隆用 反向引物	GC GAATTC TCA CGGTGGAAAAAAGGGGGCCGGGTCCC	EcoR I
30	P7A 克隆用 正向引物	GC GGATCC ATG CGGGACCCGTTGGCCTTTTTTCCACCG	BamH I
31	P7A 克隆用 反向引物	GC GAATTC TCA CGGTGGAAAAAAGGCCAACGGGTCCCG	EcoR I
32	F8A 克隆用 正向引物	GC GGATCC ATG CGGGACCCGTTGCCCGCCTTCCACCG	BamH I
33	F8A 克隆用 反向引物	GC GAATTC TCA CGGTGGAAAGGCGGGCAACGGGTCCCG	EcoR I
34	F9A 克隆用 正向引物	GC GGATCC ATG CGGGACCCGTTGCCCTTTGCCCCACCG	BamH I
35	F9A 克隆用 反向引物	GC GAATTC TCA CGGTGGGGCAAAGGGCAACGGGTCCCG	EcoR I
37	P10A 克隆用 正向引物	GC GGATCC ATG CGGGACCCGTTGCCCTTTTTTGCCCCG	BamH I
38	P10A 克隆用 反向引物	GC GAATTC TCA CGGGGCAAAAAAGGGCAACGGGTCCCG	EcoR I
39	P11A 克隆用 正向引物	GC GGATCC ATG CGGGACCCGTTGCCCTTTTTTCCAGCC	BamH I

[0089]

40	P11A 克隆用	GC GAATTC TCA	EcoR I
	反向引物	GGCTGGAAAAAAGGGCAACGGGTCCCG	

[0090] 图5是通过蛋白质印迹分析及考马斯亮蓝染色显示对2B8抗体的二次表位鉴定的结果。如图5所示,2B8抗体的其它表位确认为是包含DrBphP整个氨基酸序列 (SEQ ID NO:3) 中的以N-末端为基准的第3-11位的氨基酸序列同时,第8个氨基酸残基苯丙氨酸被替换为丙氨酸的肽 (用F8A表示,SEQ ID NO:2);或者包含DrBphP的整个氨基酸序列 (SEQ ID NO:3) 中的以N-末端为基准的第3-11位的氨基酸序列同时,第10个氨基酸残基脯氨酸被替换为丙氨酸的肽 (用P10A表示,SEQ ID NO:36)。上述2B8抗体的其它表位也可作为肽标签来使用,特别是由SEQ ID NO:2的氨基酸序列构成的肽与2B8抗体的结合程度特异性地增强,因此被认为是优异的肽标签。

[0091] 实施例6:利用BRT标签的融合蛋白质的制备及利用BRT标签抗体的融合蛋白质的检测

[0092] 利用本发明的BRT标签制备融合蛋白质,并利用对应于BRT标签的单克隆抗体2B8检测上述融合蛋白质。

[0093] 6-1:大肠杆菌 (E.coli) 中的融合蛋白质的表达及检测

[0094] 为了确认包含本发明的BRT标签的融合蛋白质是否在大肠杆菌 (E.coli) 中正常表达,以及表达出的融合蛋白质是否能够用2B8单克隆抗体来进行检测,因此制备了编码GST (Glutathion-S-Transferase) 蛋白质前连接有BRT标签的融合蛋白质的DNA构建体。为克隆编码本发明的BRT标签的DNA及编码c-myc标签的DNA,制备了各自所对应的引物。利用制备的引物及PrimeSTAR HS (TAKARA,R040) 聚合酶,进行约30个循环的PCR,从而获得了扩增的DNA产物。用于上述DNA克隆的PCR反应不需要额外的模板,在进行PCR的一次循环时,通过正向引物 (Forward Primer) 和反向引物 (Reverse primer) 的结合,可得到用于扩增的模板。以下表5示出了为获得上述DNA扩增产物,而进行PCR时所使用的引物。从扩增的PCR产物中分离出所需的DNA后,将其结合 (ligation) 于pJET (CloneJET PCR cloning kit, Fermentas,#K1232) 载体。之后,将上述结合载体委托给韩国柏业公司 (Bioneer co. (KR)) 测定碱基序列。其结果确认了通过PCR生成的DNA产物具有所需的目标碱基序列。

[0095] 表5

[0096]

SEQ ID NO	引物种类	碱基序列 (5'→3')	包含于引物的限制性 内切酶识别部位
41	克隆 BRT 标签用 正向引物	GCCTCGAGGGATCCATGCGGGACCC GTTGCCCTTTTTT	BamH I
42	克隆 BRT 标签用 反向引物	GCGAGCTCGAATTCTCACGGTGGAA AAAAGGGCAACGG	EcoR I
43	克隆 c-myc 标签用 正向引物	GCGGATCCATGGAACAAAAATTAATT TCTGAAGAAGATTTA	BamH I
44	克隆 c-myc 标签用 反向引物	GCGAATTCTCATAAATCTTCTTCAGA AATTAATTTTGTTC	EcoR I

[0097] 之后,将分离出的DNA产物结合于既是表达载体又包含可自行编码GST (Glutathion-S-Transferase)蛋白质的DNA的pGEX4T1载体((GE Healthcare,Piscataway, NJ,USA)。利用限制性内切酶BamHI与EcoRI对具体分离出的DNA产物与pGEX4T1载体((GE Healthcare,Piscataway, NJ,USA)进行切割,并用连接酶进行连接。之后,在42℃条件下的进行1分钟的热冲击(heat shock),从而将包含目的DNA的pGEX4T1载体转化至大肠杆菌BL21感受态细胞(制造商:RBC,Taipei,Taiwan)中,接着将其培养在包含氨苄青霉素的LB培养基上,从而分别表达BRT标签连接于GST蛋白质的融合蛋白质(用3-11::GST表示),以及c-myc标签连接于GST蛋白质的融合蛋白质(用Myc::GST表示)。具体而言,将转化的BL21感受态细胞在LB培养基上培养后,将生长的菌落(colony)接种在包含氨苄青霉素的LB培养基中,后在37℃条件下进行了约8个小时的种菌培养(seed culture)。将经过种菌培养的细胞接种在包含氨苄青霉素的LB培养基中,培养至OD₆₀₀值达到0.6的浓度之后,添加IPTG,使其终浓度达到0.5mM,之后在25℃条件下进行了6小时的蛋白质诱导表达。之后,利用商业销售的GST树脂(Glutathion Sepharose™ High Performance,GE Healthcare)纯化蛋白质。对于纯化的蛋白质及耐辐射球菌(Deinococcus radiodurans) BphP蛋白质进行了蛋白质印迹分析。此时,作为一抗使用了2B8单克隆抗体及抗-myc抗体,而作为二抗使用辣根过氧化物酶(HRP)偶联的抗小鼠免疫球蛋白(anti-mouse IgG;Sigma)。并且,在SDS-PAGE后,为了对转移至纤维素膜的样品进行显色,使用了阿莫仙电化学发光免疫印迹检测试剂(Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents)(GE Healthcare,RPN21060L/AF)。图6为蛋白质印迹分析结果,其表示将BRT标签贴在GST蛋白质的N-末端的融合蛋白质在大肠杆菌中能够正常表达,并能够通过2B8抗体检测融合蛋白质。如图6所示,在GST蛋白质的N-末端贴有BRT标签的融合蛋白质在大肠杆菌(E.coli)中顺利表达,而表达的融合蛋白质能够通过2B8抗体得到令人满意的检测水平。此外,与利用通常使用的标签c-myc标签及与其相对应的抗体的表位标记系统相比较时,利用BRT标签及2B8抗体的表位标记系统显示出了几乎同等水平的效果。

[0098] 6-2:植物细胞中融合蛋白质的表达及检测

[0099] 为确认本发明中包含BRT标签的融合蛋白质能否在植物细胞中正常表达,以及是否能够用2B8抗体检测表达的融合蛋白质,制备了编码GFP (Green Fluorescent Protein) 前连接BRT标签的融合蛋白质的DNA构建体。为克隆编码GFP连接本发明的BRT标签的融合蛋白质(用BRT::GFP表示)的DNA,以及编码GFP连接c-myc标签的融合蛋白质(用Myc::GFP表示)的DNA,制备了各自所对应的的引物。利用制备的引物及PrimeSTAR HS (TAKARA, R040) 聚合酶,进行约30个循环的PCR,并且作为PCR的模板,使用了编码GFP的DNA (SEQ ID NO:45)。以下表6示出了为获得上述2个DNA扩增产物,而进行PCR时所使用的引物。从扩增的PCR产物中分离出所需的DNA后,结合(ligation)于pJET (CloneJET PCR cloning kit, Fermentas, #K1232) 载体。之后,将上述结合载体委托给韩国柏业公司 (Bioneer co. (KR)) 测定碱基序列。其结果确定了通过PCR生成的DNA产物具有所需的目标碱基序列。

[0100] 表6

[0101]

SEQ ID NO	引物种类	碱基序列 (5'→3')	包含于引物的限制性内切酶识别部位
46	BRT::GFP 克隆用正向引物	GCCTCGAGATGAGGGATCCACTTCCA TTCTTCCCTCCAATGGTGAGCAAGGG CGAG	Xho I

[0102]

47	BRT::GFP 克隆用反向引物	GCGAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTCC AT	Sac I
48	Myc::GFP 克隆用正向引物	GGAGAGGACCTCGAGATGGAACAAA AGCTTATTTCTGAAGAAGATCTTATGG TGAGCAAGGGCGAG	Xho I
49	Myc::GFP 克隆用反向引物	GCGAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTCC AT	Sac I

[0103] 之后,将分离出的DNA产物接合于表达载体pBY030.2R载体,并利用上述载体对农杆菌 (Agrobacterium) LBA4404细胞进行转化。然后,在本氏烟 (Nicotiana benthamiana) (烟草) 植物体的叶子下面,用注射器 (syringe) 注入 (infiltration) Agrobacterium LBA4404,并使连接BRT标签的融合蛋白质 (用BRT::GFP表示) 及在GFP连接c-myc标签的融合蛋白质 (用Myc::GFP表示) 在各自的烟草植物体中瞬时表达 (transient expression)。详细的试验方法参照了伊莫金等 (Imogen et al) (NATURE PROTOCOL, 2006, Vol.1, NO.4, 2019-2025) 的方法。将农杆菌 (Agrobacterium) 培养至OD₆₀₀值达到0.7之后,注入至植物体,然后在培养室使植物体保持5天之后获得了样品。有没有转化可通过利用紫外线 (UV) 进行处理后,观察是否有GFP荧光来确认。获得的样品用液氮迅速冷冻,在-80℃的条件下进行保管。然后,用组织研磨仪 (TissueLyser) (QIAGEN) 粉碎烟草叶子样品,并添加提取用缓冲液

(125mM Tris-HCL pH 8.8, 1% SDS, 10% Glycerol, and 50mM Na₂S₂O₅) 之后, 利用离心机分离上层液 (supernatant), 将其用于蛋白质印迹分析。图7是表示将BRT标签连接于GFP的N-末端的融合蛋白质在植物细胞中正常表达, 且能够通过2B8抗体对融合蛋白质进行检测的蛋白质印迹分析结果。如图7所示, 将BRT标签贴于GFP的N-末端的融合蛋白质在植物细胞中与叶子的成长无相关地顺利地表达, 而表达的融合蛋白质能够通过2B8抗体得到令人满意的检测水平。此外, 与利用通常使用的标签c-myc标签及与其相对应的抗体的表位标记系统相比较时, 利用BRT标签及2B8抗体的表位标记系统显示出了几乎同等水平的效果。

[0104] 实施例7: 分析BRT标签或者2B8抗体的非特异性结合与否

[0105] 7-1: 对多种的生物体细胞内蛋白质的2B8抗体的非特异性结合与否

[0106] 为了确认2B8抗体是否与多种的细胞内蛋白质非特异性结合, 对从米 (品种: 东津 (Dongjin))、烟草 (种名: 本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*))、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*), 酵母 (种名: 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)), 大肠杆菌 (*E. coli*), 黑腹果蝇细胞S2 (*Drosophila melanogaster* S2) 及前-B细胞PD36 (Pre-B cell PD36) 中提取的蛋白质进行了蛋白质印迹分析法。此时, 使用纯化的DrBphP蛋白质作为阳性对照组, 其余的是使用了未经过进一步的纯化过程的总蛋白质的粗提取物。具体地说, 对于米 (品种: Dongjin)、烟草 (品种: *Nicotiana benthamiana*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 而言, 将用液氮冷冻后进行粉碎的物质溶解在PBS缓冲液中, 之后进行离心分离提取上层液 (supernatant), 并将其用于蛋白质印迹分析中。并且, 对于酵母 (品种: *Saccharomyces cerevisiae*), 大肠杆菌 (*E. coli*) 而言, 对细胞培养物进行离心分离收集细胞, 并将其在PBS缓冲液中混悬之后超声处理破碎细胞, 之后再次进行离心分离提取上层液 (supernatant), 并将其使用于蛋白质印迹分析中。并且, 对于黑腹果蝇细胞S2 (*Drosophila melanogaster* S2) 及前B细胞PD36 (Pre-B cell PD36) 而言, 对细胞培养物进行离心分离而收集细胞, 并将其溶解于SDS-PAGE用跑样样品 (running sample) 中使用。此外, 为了确认蛋白质印迹分析所使用的蛋白质样品的填装正确与否, 作为辅助方式实施了考马斯亮蓝染色。图8表示使用2B8抗体对多种细胞蛋白质进行蛋白质印迹分析的结果, 以及对用于蛋白质印迹分析的细胞蛋白质样品进行考马斯亮蓝染色的结果。如图8所示, 2B8抗体与含有BRT标签的DrBphP蛋白质特异地结合, 但并未观察到2B8抗体和多种细胞内蛋白质间的非特异性结合。

[0107] 7-2: 包含BRT标签及2B8抗体的表位标记系统的非特异性结合与否

[0108] 通过转化细胞的培养而使在DrBphN蛋白质 (SEQ ID NO:6) 中去除第1~11位的氨基酸的DrBphN变形蛋白质的C-末端分别结合BRT标签、Flag标签、His标签及Myc标签的融合蛋白质表达, 并提取总蛋白质后通过蛋白质印迹分析观察了状况。首先, 为了对编码上述DrBphN变形蛋白质的C-末端连接BRT标签的融合蛋白质 (用12-321::BRT表示) 的DNA、编码DrBphN变形蛋白质的C-末端连接Flag标签的融合蛋白质 (用12-321::Flag表示) 的DNA、编码DrBphN变形蛋白质的C-末端连接His标签的融合蛋白质 (用12-321::His表示) 的DNA、编码DrBphN变形蛋白质的C-末端连接Myc标签的融合蛋白质 (用12-321::Myc表示) 的DNA进行克隆, 制备了各自所对应的引物。以下表7示出了为了获得4个扩增产物, 而进行的PCR时所使用的引物。以下表7中SEQ ID NO:50的引物是以DrBphN蛋白质的第12位的氨基酸所对应的碱基序列为起点向右方向互补结合的正向引物 (forward primer), 是对应其余4个反向引物的共同引物 (common primer)。并且, SEQ ID NO:51至SEQ ID NO:54的引物分别包括标

筌碱基序列,其为以DrBphN蛋白质的第321位氨基酸所对应的碱基序列为起点向左方向互补结合的反向引物(reverse primers)。利用制备的引物及PrimeSTAR HS (TAKARA,R040)聚合酶,进行约30个循环的PCR,并且作为PCR的模板,使用了DrBphP DNA (SEQ ID NO:5)。从扩增的PCR产物中分离所需的DNA之后,将其结合(ligation)于pJET (CloneJET PCR cloning kit,Fermentas,#K1232)载体。之后,将上述结合载体委托给韩国柏业公司(Bioneer co.(KR))测定碱基序列。其结果确定了通过PCR生成的DNA产物具有所需的目标碱基序列。

[0109] 表7

[0110]

SEQ ID NO	引物种类	碱基序列 (5'→3')
50	DrBphN 变形蛋白质 12-321 克隆用正向引物	CCATGGCA CCGCTTTACCTTGGTGGCCCCG
51	12-321::BRT 克隆用 反向引物	CTCGAG TCA CGGTGGAAAAAAGGGCAACGGGTCCCG CGCTTCCTTGACCTGAACTTG
52	12-321::Flag 克隆用 反向引物	CTCGAG TCA CTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC CGCTTCCTTGACCTGAACTTG
53	12-321::His 克隆用 反向引物	CTCGAG TCA GTGGTGGTGGTGGTGGTG CGCTTCCTTGACCTGAACTTG
54	12-321::Myc 克隆用 反向引物	CTCGAG TCA TAAATCTTCTTCAGAAATTAAATTTTGTTT CGCTTCCTTGACCTGAACTTG

[0111] 之后,利用限制性内切酶Nde 1和Xho 1将扩增的DNA产物分别插入于Pet28a (+) 载体(制造商:Novagen),在42℃条件下,对大肠杆菌BL21感受态细胞(制造商:RBC,Taipei,Taiwan)进行1分钟热冲击(heat shock)使其转化,将其在含有卡那霉素的LB培养基上进行培养。将转化的BL21感受态细胞在LB培养基上培养后,将生长的菌落(colony)接种在含有卡那霉素的LB培养基中,后在37℃条件下进行了约8个小时的种菌培养(seed culture)。将经过种菌培养的细胞接种在含有卡那霉素的LB培养基中,培养至OD₆₀₀值达到0.6的浓度之后,添加IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside),使其终浓度达到0.5mM,之后在25℃条件下进行了6小时的蛋白质诱导表达。此后,对细胞进行离心分离后除去上层液,再用结合缓冲液(100mM Tris-Cl,150mM NaCl,及10mM咪唑,pH 8.0)使细胞团(pellet)重悬。然后对重悬的细胞团进行超声处理破碎细胞,再次进行离心分离后分离上层液(supernatant),并将其用于蛋白质印迹分析中。此时,作为一抗使用2B8单克隆抗体、抗-flag抗体、抗-his抗体及抗-myc抗体的混合抗体,作为二抗使用辣根过氧化物酶(HRP)偶联的抗小鼠免疫球蛋白(anti-mouse IgG;Sigma)。并且,在SDS-PAGE后,为了对转移至纤维素

膜的样品进行显色,使用了阿莫仙电化学发光免疫印迹检测试剂(AmershamTM ECLTM Western Blotting Detection Reagents)(GE Healthcare,RPN21060L/AF)。另外,为了确认DrBphN变形蛋白质的表达,使用可以确认蛋白质的其它单克隆抗体,即2C11抗体作为一抗进行了蛋白质印迹分析。此外,为了确认蛋白质印迹分析所使用的蛋白质样品的填装正确与否,作为辅助方式实施了考马斯亮蓝染色。图9表示通过对转化细胞进行培养,使在DrBphN蛋白质(SEQ ID NO:6)中去除第1~11位的氨基酸的DrBphN变形蛋白质的C-末端分别结合BRT标签、Flag标签、His标签及Myc标签的融合蛋白质表达,并在提取总蛋白质后通过蛋白质印迹分析观察表达状态的结果,以及对用于蛋白质印迹分析的各种融合蛋白质样品进行考马斯亮蓝染色的结果。如图9所示,从使用2C11抗体的蛋白质印迹分析结果可确认DrBphN变形蛋白质的C-末端分别结合BRT标签、Flag标签、His标签及Myc标签的融合蛋白质的大小为约35KDa。并且,在DrBphN变形蛋白质的C-末端结合的BRT标签的表达量良好,且推测与2B8抗体特异地结合。但是,在DrBphN变形蛋白质的C-末端结合His标签进行表达时,未通过抗-his抗体检测出来;且为His标签及Flag标签时,确认了与各自的抗体不对应的非特异性条带。

[0112] 如上所述,将本发明通过上述的实施例进行了说明,但是,本发明并不仅仅限定于此,在不脱离本发明的范畴和意图的范围内,显然可以实施多种的变形实施。并且,本发明要求保护的应被解释为包括属于本发明所附的权利要求范围内的所有实施例。

国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约

国际格式

原始保藏证明

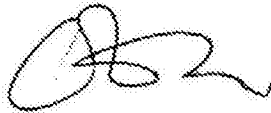
根据规则7.1发布

至：大盛熙

庆熙大学生物技术和植物代谢研究中心研究院

韩国京畿道龙仁市器兴区德荣大路1732, 446-701

[0113]

I. 微生物名称	
由保藏人提供的名称： 2B8 (动物细胞系)	国际保藏机构授予的 保藏编号： KCTC 12283BP
II. 科学描述和/或建议的分类学位置	
随经上述 I 鉴定的微生物附有： ☒ 科学描述 ☐ 建议的分类学上的位置 (对于适用的情况画叉号)	
III. 受理及保藏	
本国际保藏机构同意保藏经上述 I 鉴定的，于2012年9月24日受理的微生物。	
IV. 转换请求的受理	
本国际保藏机构于 受理了经上述 I 鉴定的上述微生物，并于 收到了 将原始保藏转换成符合布达佩斯条约的保藏的请求。	
V. 国际保藏机构	
名称：韩国微生物保藏中心 地址：韩国生物科学与生物技术 研究所 (KRIBB) 韩国大田儒城区 科学路125, 305-806	代表保藏机构的 代表人：  裴景淑 主任 日期：2012年10月5日

格式 BP/4 (KCTC 格式 17)

单页

[0001]

<110>	庆熙大学校产学协力团 明知大学校产学协力团
<120>	表位标记用抗体、杂交瘤细胞株以及其用途
<130>	PCT-13-104
<150>	10-2012-0079615
<151>	2012-07-20
<150>	10-2012-0124733
<151>	2012-11-06
<160>	54
<170>	Kopotentln 2.0
<210>	1
<211>	9
<212>	PRT
<213>	耐辐射球菌BphP第3-11位的氨基酸
<400>	1
	Arg Asp Pro Leu Pro Phe Phe Pro Pro
	1 5
<210>	2
<211>	9
<212>	PRT
<213>	人工序列
<220>	
<223>	耐辐射球菌BphP第3-11位中第8位苯丙氨酸被替换的氨基酸
<400>	2
	Arg Asp Pro Leu Pro Ala Phe Pro Pro
	1 5
<210>	3
<211>	755
<212>	PRT
<213>	耐辐射球菌BphP
<400>	3
	Met Ser Arg Asp Pro Leu Pro Phe Phe Pro Pro Leu Tyr Leu Gly Gly
	1 5 10 15
	Pro Glu Ile Thr Thr Glu Asn Cys Glu Arg Glu Pro Ile His Ile Pro
	20 25 30

[0002]

Gly	Ser	Ile	Gln	Pro	His	Gly	Ala	Leu	Leu	Thr	Ala	Asp	Gly	His	Ser	35	40	45	
Gly	Glu	Val	Leu	Gln	Met	Ser	Leu	Asn	Ala	Ala	Thr	Phe	Leu	Gly	Gln	50	55	60	
Glu	Pro	Thr	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Thr	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Pro	Glu	65	70	75	80
Gln	Trp	Pro	Ala	Leu	Gln	Ala	Ala	Leu	Pro	Pro	Gly	Cys	Pro	Asp	Ala	85	90	95	
Leu	Gln	Tyr	Arg	Ala	Thr	Leu	Asp	Trp	Pro	Ala	Ala	Gly	His	Leu	Ser	100	105	110	
Leu	Thr	Val	His	Arg	Val	Gly	Glu	Leu	Leu	Ile	Leu	Glu	Phe	Glu	Pro	115	120	125	
Thr	Glu	Ala	Trp	Asp	Ser	Thr	Gly	Pro	His	Ala	Leu	Arg	Asn	Ala	Met	130	135	140	
Phe	Ala	Leu	Glu	Ser	Ala	Pro	Asn	Leu	Arg	Ala	Leu	Ala	Glu	Val	Ala	145	150	155	160
Thr	Gln	Thr	Val	Arg	Glu	Leu	Thr	Gly	Phe	Asp	Arg	Val	Met	Leu	Tyr	165	170	175	
Lys	Phe	Ala	Pro	Asp	Ala	Thr	Gly	Glu	Val	Ile	Ala	Glu	Ala	Arg	Arg	180	185	190	
Glu	Gly	Leu	His	Ala	Phe	Leu	Gly	His	Arg	Phe	Pro	Ala	Ser	Asp	Ile	195	200	205	
Pro	Ala	Gln	Ala	Arg	Ala	Leu	Tyr	Thr	Arg	His	Leu	Leu	Arg	Leu	Thr	210	215	220	
Ala	Asp	Thr	Arg	Ala	Ala	Ala	Val	Pro	Leu	Asp	Pro	Val	Leu	Asn	Pro	225	230	235	240
Gln	Thr	Asn	Ala	Pro	Thr	Pro	Leu	Gly	Gly	Ala	Val	Leu	Arg	Ala	Thr	245	250	255	
Ser	Pro	Met	His	Met	Gln	Tyr	Leu	Arg	Asn	Met	Gly	Val	Gly	Ser	Ser	260	265	270	
Leu	Ser	Val	Ser	Val	Val	Val	Gly	Gly	Gln	Leu	Trp	Gly	Leu	Ile	Ala	275	280	285	
Cys	His	His	Gln	Thr	Pro	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Asp	Leu	Arg	Thr	Thr	290	295	300	
Leu	Glu	Tyr	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Ser	Leu	Gln	Val	Gln	Val	Lys	Glu	305	310	315	320

[0003]

Ala Ala Asp Val	Ala Ala Phe Arg Gln Ser Leu Arg Glu His His Ala
325	330 335
Arg Val Ala Leu Ala Ala Ala His Ser Leu Ser Pro His Asp Thr Leu	
340	345 350
Ser Asp Pro Ala Leu Asp Leu Leu Gly Leu Met Arg Ala Gly Gly Leu	
355	360 365
Ile Leu Arg Phe Glu Gly Arg Trp Gln Thr Leu Gly Glu Val Pro Pro	
370	375 380
Ala Pro Ala Val Asp Ala Leu Leu Ala Trp Leu Glu Thr Gln Pro Gly	
385	390 395 400
Ala Leu Val Gln Thr Asp Ala Leu Gly Gln Leu Trp Pro Ala Gly Ala	
405	410 415
Asp Leu Ala Pro Ser Ala Ala Gly Leu Leu Ala Ile Ser Val Gly Glu	
420	425 430
Gly Trp Ser Glu Cys Leu Val Trp Leu Arg Pro Glu Leu Arg Leu Glu	
435	440 445
Val Ala Trp Gly Gly Ala Thr Pro Asp Gln Ala Lys Asp Asp Leu Gly	
450	455 460
Pro Arg His Ser Phe Asp Thr Tyr Leu Glu Glu Lys Arg Gly Tyr Ala	
465	470 475 480
Glu Pro Trp His Pro Gly Glu Ile Glu Glu Ala Gln Asp Leu Arg Asp	
485	490 495
Thr Leu Thr Gly Ala Leu Gly Glu Arg Leu Ser Val Ile Arg Asp Leu	
500	505 510
Asn Arg Ala Leu Thr Gln Ser Asn Ala Glu Trp Arg Gln Tyr Gly Phe	
515	520 525
Val Ile Ser His His Met Gln Glu Pro Val Arg Leu Ile Ser Gln Phe	
530	535 540
Ala Glu Leu Leu Thr Arg Gln Pro Arg Ala Gln Asp Gly Ser Pro Asp	
545	550 555 560
Ser Pro Gln Thr Glu Arg Ile Thr Gly Phe Leu Leu Arg Glu Thr Ser	
565	570 575
Arg Leu Arg Ser Leu Thr Gln Asp Leu His Thr Tyr Thr Ala Leu Leu	
580	585 590
Ser Ala Pro Pro Pro Val Arg Arg Pro Thr Pro Leu Gly Arg Val Val	

[0004]

	595		600		605
Asp Asp Val Leu Gln Asp Leu Glu Pro Arg Ile Ala Asp Thr Gly Ala					
610		615		620	
Ser Ile Glu Val Ala Pro Glu Leu Pro Val Ile Ala Ala Asp Ala Gly					
625	630		635		640
Leu Leu Arg Asp Leu Leu Leu His Leu Ile Gly Asn Ala Leu Thr Phe					
	645		650		655
Gly Gly Pro Glu Pro Arg Ile Ala Val Arg Thr Glu Arg Gln Gly Ala					
	660		665		670
Gly Trp Ser Ile Ala Val Ser Asp Gln Gly Ala Gly Ile Ala Pro Glu					
	675		680		685
Tyr Gln Glu Arg Ile Phe Leu Leu Phe Gln Arg Leu Gly Ser Leu Asp					
	690		695		700
Glu Ala Leu Gly Asn Gly Leu Gly Leu Pro Leu Cys Arg Lys Ile Ala					
705		710		715	720
Glu Leu His Gly Gly Thr Leu Thr Val Glu Ser Ala Pro Gly Glu Gly					
	725		730		735
Ser Thr Phe Arg Cys Trp Leu Pro Asp Ala Gly Pro Leu Pro Gly Ala					
	740		745		750
Ala Asp Ala					
	755				

<210> 4
 <211> 2268
 <212> DNA
 <213> 编码耐辐射球菌BphP的核苷酸

<400> 4	
atgagccggg acccgttgc ctttttccn ccgetttacc ttggtggecc ggacattacc	60
accgagaact gcgagcgca gccgaticat attcccggca gcatccagcc gcacggcgcc	120
cigtccactg ccgacgggca cagcggcgag gtgcctcaga tgagcctcaa cggggccact	180
tttctgggac aggaacccac agtgcigcgc ggacagaccc tcgcgcact getgcccag	240
cagtgcccg cgtgcgaagc ggccctgcgc cccggctgcc ccgacgcct gcaataccgc	300
gcaacgctgg actggccigc cgcggggcac ctttgcctga cgggtgcacc ggtcggcgag	360
ttgtgatcc tggaaattca gccgacggag gccctgggaca gcaccgggccc gcacgcctg	420

[0005]

cgcaacgaga tgttcggcgt cgaagatgcc eccaaccctg gggcgctggc cgaggtggcg	480
acccagacgg tccgcagat gacgggcttt gaccgggtga tgcctacaa atttgcctcc	540
gacgccaccg gcgaagtgat tgcggaggcc cgcctgagg ggcctgcacg ctctcaggc	600
caccgtttt cccgtctgga catccggcg cagccccgg cgtctacac ccagcaccgt	660
ctgggccctga ccccgacac cccggccggc ggcgtggcg tcatccctt cctcaccgg	720
cagacgaatg cggccacccc gctggggggc ggcgtgcct ggcacacct gcccatgac	780
atgcaglace tgcggaaat gggcgctggg tcgagccgt cgggtgcgtt gggtgcgtt	840
ggccagctct ggggcctgat cgcctgccac caccagacg cctacgtgt gccgcggac	900
ctggaacca cgtctgaata cctggggcgc ttgtgagcc tgcgaagta ggtaaggaa	960
gcggcggacg tggggcctt tgcgcagag ctcggggag accacgcgc gggtggcctc	1020
gcggcggcgc actcgtctc ggcgaagac accctcagtg acccggcgt tgacctgtg	1080
ggcctgatgc gggccggggg cctgattctg cgttctgagg ggcgtggca gacgttgggt	1140
gaagtgcgc ctcgccggc ggtggagcg ctgtggcgt ggtctgaaa ccagccgggc	1200
gcccctggcc agaccgacg gctgggccc cttgtggccg ccggcgcca tctcgcctc	1260
agcgcagcgg gctgtctgc catcagcgt ggcgaggct ggtcggagt cctcgtctg	1320
ctggggcccg aactgcggct ggaggctgcc tggggcggg caactctga ccaggcgaaa	1380
gacgacctg ggcgcgcca ctattcgac acctacctg aagaaaaacg cggctacgc	1440
gagccctggc atcccgcca aatcgaggag ggcaggatc tacgtgacn atgaccggg	1500
gcgttggcg agcgcctgag cgtattctg gacctcaac gggcgtcac acagtgaac	1560
gccgagtggc ggcagctacg ctctgtatc agccaccaca tgcaggagc gggtcgctc	1620
atctcgaagt tgcgcagtt gctgacgcg cagcccccg cccaggacg gtcctcgac	1680
tctccgaga ccgagcgat caccgcttt ctgtgcgcg aaacgtcgc cctgcgcagc	1740
ctgacgaag acctcaccn ctacaccgc ctgtctctg caccgcgcc ggtgcgcgc	1800
cccacgcgc tgggcgcgt ggtggacgat gtgtgcgaag acctcgaacc ccgcatgcc	1860
gacaccggag cgagcatga ggtggcgccc gatttgcct tcatcctgc cgacgttgc	1920
ctgtgcgcg acctgtctg gcatctgac ggcaacgcg tgacgtttg tggccggag	1980
ccgcgtatt ccgtaaggac cgaacggcaa ggccgggtt ggctatcgc ggtcagtgac	2040

[0006]

caggggcgctg gcatgegeec cgagatlcag gaacgancct tictgctggt tcagcggctc	2100
ggttcgcctg atgagggcgt gacacacggc ctgggctctg cgcctggccg caagatcgcc	2160
gaactgcatt ggcgcacctt gaccgiggag tccgcgccag gcgagggcag caccctccgt	2220
tgcctggctg ccgatgcctg gctcttccg ggagccgcgc atgctga	2268

<210> 5

<211> 963

<212> DNA

<213> 编码耐辐射球菌BphP第1-321位的氨基酸的核苷酸

<400> 5

atgagccggg acccgttgc ctttttcca ccctttacc ttggtgccc ggaaattacc	60
accgagaact gcgagcgga gccattcat attcccgca gcatccagcc gcacggcgcc	120
ctgtcaactg ccgacgggca cagcggcgag gtgtccaga tgagcctcaa cggggcact	180
ttctgggac aggaaccac agtgtgcgc ggacagccc tgcgcgact gtgcccag	240
cagtggcccg cgttgcagg gccctgccc ccgggtgcc ccgacgccc gcataccgc	300
gcaacgttg actggctgc cgcggggcac ctltgccta cggtcaccc ggctggcgag	360
ttgtgattc tggatttga gccgacggag gccctggaca gcaccggcc gcacgcctg	420
cgcaacgga tgltcgctt cgaatgtgc cccacctgc gggtgtggc cgaggtggc	480
accagacgg tcccgagct gacgggttt gccgggtga tgcctacaa atttgcccc	540
gacgccacc ggaagtgt tgcgaggcc cgcctgagg ggtgcacgc ctltctggc	600
caactttt ccggtcgga cttccggcg caggcccgc cgtctacac ccggaacct	660
ctgcctga ccgcgacac ccgcgcgcc gccgtgcgc tgatccgt cctaacccg	720
cagacgaatg cccccccc gctgggcgc gccgtgtgc ggcacctc gccatgcac	780
atgcagacc tgcggaacat gggcgtcgg tcgagcctgt cgggtcgtt ggtgtcggc	840
ggccagctct ggagctgat cgcctgccac caccagacgc cctacgtgt gccgcccgc	900
ctggaacca cgtcgaata cctgggcrgc ttgtgagcc tgaagtta ggtaaggaa	960
gcg	963

<210> 6

<211> 321

<212> PRT
 <213> 耐辐射球菌BphP第1-321位的氨基酸
 <400> 6
 Met Ser Arg Asp Pro Leu Pro Phe Phe Pro Pro Leu Tyr Leu Gly Gly
 1 5 10 15
 Pro Glu Ile Thr Thr Glu Asn Cys Glu Arg Glu Pro Ile His Ile Pro
 20 25 30
 Gly Ser Ile Gln Pro His Gly Ala Leu Leu Thr Ala Asp Gly His Ser
 35 40 45
 Gly Glu Val Leu Gln Met Ser Leu Asn Ala Ala Thr Phe Leu Gly Gln
 50 55 60
 Glu Pro Thr Val Leu Arg Gly Gln Thr Leu Ala Ala Leu Leu Pro Glu
 65 70 75 80
 Gln Trp Pro Ala Leu Gln Ala Ala Leu Pro Pro Gly Cys Pro Asp Ala
 85 90 95
 Leu Gln Tyr Arg Ala Thr Leu Asp Trp Pro Ala Ala Gly His Leu Ser
 100 105 110
 Leu Thr Val His Arg Val Gly Glu Leu Leu Ile Leu Glu Phe Glu Pro
 115 120 125
 Thr Glu Ala Trp Asp Ser Thr Gly Pro His Ala Leu Arg Asn Ala Met
 130 135 140
 Phe Ala Leu Glu Ser Ala Pro Asn Leu Arg Ala Leu Ala Glu Val Ala
 145 150 155 160
 Thr Gln Thr Val Arg Glu Leu Thr Gly Phe Asp Arg Val Met Leu Tyr
 165 170 175
 Lys Phe Ala Pro Asp Ala Thr Gly Glu Val Ile Ala Glu Ala Arg Arg
 180 185 190
 Glu Gly Leu His Ala Phe Leu Gly His Arg Phe Pro Ala Ser Asp Ile
 195 200 205
 Pro Ala Gln Ala Arg Ala Leu Tyr Thr Arg His Leu Leu Arg Leu Thr
 210 215 220
 Ala Asp Thr Arg Ala Ala Ala Val Pro Leu Asp Pro Val Leu Asn Pro
 225 230 235 240
 Gln Thr Asn Ala Pro Thr Pro Leu Gly Gly Ala Val Leu Arg Ala Thr
 245 250 255
 Ser Pro Met His Met Gln Tyr Leu Arg Asn Met Gly Val Gly Ser Ser

[0007]

[0008]

	260		265		270										
Leu	Ser	Val	Ser	Val	Val	Val	Gly	Gly	Gln	Leu	Trp	Gly	Leu	Ile	Ala
	275						280						285		
Cys	His	His	Gln	Thr	Pro	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Asp	Leu	Arg	Thr	Thr
	290						295				300				
Leu	Glu	Tyr	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Ser	Leu	Gln	Val	Gln	Val	Lys	Glu
305					310						315				320

Ala

<210> 7
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 编码耐辐射球菌BphP第3-11位氨基酸的核苷酸

<400> 7
 cgggaccctgt tgccttttt tccaccg 27

<210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码耐辐射球菌BphP第3-11位中第8位苯丙氨酸被替换的氨基酸的核苷酸

<400> 8
 cgggaccctgt tgcctgcttt tccaccg 27

<210> 9
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 耐辐射球菌BphP的正向引物

<400> 9
 gccatatgat gagccgggac ccgttgcct 29

<210> 10
 <211> 29
 <212> DNA

[0009]

<213> 人工序列

<220>

<223> 耐辐射球菌BphP的反向引物

<400> 10

gccctcgagtc aggcctcggc cgcctccgg

29

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 耐辐射球菌BphP第1-321位氨基酸的正向引物

<400> 11

gccataatgat gaggcgggac ccgttgccc

29

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 耐辐射球菌BphP第1-321位氨基酸的反向引物

<400> 12

gcctcgagcg cttccttgac ctgaaattg

29

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 耐辐射球菌BphP第3-12位氨基酸

<400> 13

Arg Asp Pro Leu Pro Phe Phe Pro Pro Leu
1 5 10

<210> 14

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 耐辐射球菌BphP第3-12位氨基酸的正向引物

[0010]

<400> 14
gcccgcaggg atccatgcgg gacccgllgc cctttttt 38

<210> 15
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 耐辐射球菌BphP第3-12位氨基酸的反向引物

<400> 15
gcgagctcga attctcaaag cggctggaaaa aagggcaa 38

<210> 16
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 耐辐射球菌BphP第3-11位氨基酸的正向引物

<400> 16
gcccgcaggg atccatgcgg gacccgllgc cctttttt 38

<210> 17
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 耐辐射球菌BphP第3-11位氨基酸的反向引物

<400> 17
gcgagctcga attctcacgg tggaaaaaag ggcaacgg 38

<210> 18
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 耐辐射球菌BphP第3-10位氨基酸的正向引物

[0011]

<400>	18		
		gcctcgaggg atccatgagg gacccgttgc ctttttt	38
<210>	19		
<211>	38		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>		耐辐射球菌BphP第3-10位氨基酸的反向引物	
<400>	19		
		gcgagctcga attctcattg aaaaaagggc aacgggtc	38
<210>	20		
<211>	38		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>		耐辐射球菌BphP第4-12位氨基酸的正向引物	
<400>	20		
		gcctcgaggg atccatggac ccgttgccct ttittcca	38
<210>	21		
<211>	38		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>		耐辐射球菌BphP第4-12位氨基酸的反向引物	
<400>	21		
		gcgagctcga attctcaaag ccgttgaaaa aagggtcaa	38
<210>	22		
<211>	38		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>		耐辐射球菌BphP第3-11位中第3位精氨酸被替换的氨基酸的正向引物	

[0012]

<400> 22
gaggatccat ggcgcacccg ttgccctttt ttccaccg 38

<210> 23
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 耐辐射球菌BphP第3-11位中第3位精氨酸被替换的氨基酸的反向引物

<400> 23
gcgaattctc acggiggaaa aaagggcaac gggtcggc 38

<210> 24
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 耐辐射球菌BphP第3-11位中第4位天冬氨酸被替换的氨基酸的正向引物

<400> 24
gaggatccat gggggccccg ttgccctttt ttccaccg 38

<210> 25
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 耐辐射球菌BphP第3-11位中第4位天冬氨酸被替换的氨基酸的反向引物

<400> 25
gcgaattctc acggiggaaa aaagggcaac ggggcccc 38

<210> 26
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 耐辐射球菌BphP第3-11位中第5位脯氨酸被替换的氨基酸的正向引物

<400> 26

[0013]

gcggatccat gcgggacccg ttgccccttt ttccaccg 38

<210> 27
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 耐辐射球菌BphP第3-11位中第5位脯氨酸被替换的氨基酸的反向引物

<400> 27
 gcgaatttc acggtggaaa aaagggaag gcgtcccg 38

<210> 28
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 耐辐射球菌BphP第3-11位中第6位亮氨酸被替换的氨基酸的正向引物

<400> 28
 gcggatccat gcgggacccg gcccctttt ttccaccg 38

<210> 29
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 耐辐射球菌BphP第3-11位中第6位亮氨酸被替换的氨基酸的反向引物

<400> 29
 gcgaatttc acggtggaaa aaagggggc gggtcccg 38

<210> 30
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 耐辐射球菌BphP第3-11位中第7位脯氨酸被替换的氨基酸的正向引物

<400> 30
 gcggatccat gcgggacccg ttggcctttt ttccaccg 38

[0014]

<210>	31	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	耐辐射球菌BphP第3-11位中第7位脯氨酸被替换的氨基酸的反向引物	
<400>	31	
	gcgaattctc acggctggaaa aaaggccaac gggctcccg	38
<210>	32	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	耐辐射球菌BphP第3-11位中第8位苯丙氨酸被替换的氨基酸的正向引物	
<400>	32	
	gcggatccat ggggacccg ttgcccgeet ttcacccg	38
<210>	33	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	耐辐射球菌BphP第3-11位中第8位苯丙氨酸被替换的氨基酸的反向引物	
<400>	33	
	gcgaattctc acggctggaaa ggctgggcaac gggctcccg	38
<210>	34	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	耐辐射球菌BphP第3-11位中第9位苯丙氨酸被替换的氨基酸的正向引物	
<400>	34	
	gcggatccat ggggacccg ttgccccttg ccccacccg	38

[0015]

<210> 35
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 耐辐射球菌BphP第3-11位中第9位苯丙氨酸被替换的氨基酸的反向引物

<400> 35

gcgaattctc acggtagggc aaagggcaac gggtcccg

38

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 耐辐射球菌BphP第3-11位中第10位脯氨酸被替换的氨基酸

<400> 36

Arg Asp Pro Leu Pro Phe Phe Ala Pro
 1 5

<210> 37

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 耐辐射球菌BphP第3-11位中第10位脯氨酸被替换的氨基酸正向引物

<400> 37

gcggatccat gcgggaccgc ttgccccttt ttgcccgc

38

<210> 38

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 耐辐射球菌BphP第3-11位中第10位脯氨酸被替换的氨基酸反向引物

<400> 38

gcgaattctc acggggcaaa aaagggcaac gggtcccg

38

[0016]

<210>	39	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	耐辐射球菌BphP第3-11位中第11位脯氨酸被替换的氨基酸正向引物	
<400>	39	
	gcggatccat gcgggaccgc ttgccctttt ttcagcc	38
<210>	40	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	耐辐射球菌BphP第3-11位中第11位脯氨酸被替换的氨基酸反向引物	
<400>	40	
	gcgaatttc agctggaaa aaagggaac gggtcccg	38
<210>	41	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	耐辐射球菌BphP第3-11位氨基酸的正向引物	
<400>	41	
	gcctcgagg atccaigcg gaccgltgc cctttttt	38
<210>	42	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	耐辐射球菌BphP第3-11位氨基酸的反向引物	
<400>	42	
	gcgagctga attctcagg tggaaaaaag ggcaacgg	38

[0017]

<210> 43
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> c-myc标签正向引物

<400> 43
 gggatccat ggaacaaaaa ttaatttctg aagaagattt a 41

<210> 44
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> c-myc标签反向引物

<400> 44
 ggaattctc ataaattctt ttccagaaatt aattttgtt c 41

<210> 45
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码绿色荧光蛋白质的核苷酸

<400> 45
 atggtagaca agggcgagga gcgttcacc ggggtgggac ccaccctggt cgagctggac 60
 ggagacgtaa acggccacaa gtccagcgtg tccggcgagg gcgagggcga cgccaccctac 120
 ggcaagctga cctgaaggtt cctcgcacc accggcaagg tgcctgtgcc ctgcccacc 180
 ctctgagcca ccttcagcta cggcgtgcag tgcctcagcc gctaccccca ccacatgaag 240
 cagcaggaet tctcaagtc cggcatgccc gaaggctaag tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtag agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcctcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacaa cagccacaa cgtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540

[0018]

gaccactacc agcagAACAC cccatcgge gacggccccg tgcigrigcc cgacaaccac	600
taccigagca cccaglcgc cclgagcaca gaccccaag aggaagcaga tccatgggc	660
cigciggagi tcgigaccgc cgcggggatc acicagggca tggacgagci gicccaglaa	720
	720

<210> 46
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> BRT标记绿色荧光蛋白质的正向引物

<400> 46	
gcctcgagat gaggatcca ctccattct tccctccaat ggigagcaag gacgag	56

<210> 47
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> BRT标记绿色荧光蛋白质的反向引物

<400> 47	
gcgagctctt actigtacag ctgctccat	29

<210> 48
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> c-myc标记绿色荧光蛋白质的正向引物

<400> 48	
ggagaggacc tcgagatgga acaaaagcct attctgaag aagatcttat ggtgagcaag	60
ggcgag	66

<210> 49
 <211> 29

[0019]

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c-myc标记绿色荧光蛋白质的反向引物	
<400>	49	29
gcgagctctt actgtacag ctgtccat		
<210>	50	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	耐辐射球菌BphP第12-321位氨基酸的正向引物	
<400>	50	29
ccaatggcacc gctttaccit ggtggcccg		
<210>	51	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BRT标记耐辐射球菌BphP第12-321位氨基酸的反向引物	
<400>	51	57
ctcgagtcac ggtggaaaaa agggcaacgg gtcccgcgct tcttgacct gaacttg		
<210>	52	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Flag标记耐辐射球菌BphP第12-321位氨基酸的反向引物	
<400>	52	54
ctcgagtcac ttatcgicgl catccttgta atccgcttcc ttgacctgaa ctig		
<210>	53	
<211>	48	
<212>	DNA	

[0020]

<213> 人工序列

<220>

<223> His标记耐辐射球菌BphP第12-321位氨基酸的反向引物

<400> 53

ctcgagtcag tgggggggt ggtggggcgc ttcttgacc tgaacttg

48

<210> 54

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> c-myc标记耐辐射球菌BphP第12-321位氨基酸的反向引物

<400> 54

ctcgagtcac aaatcttctt cagaaattaa tttttgttcc gcttcttga ccgaacttg

60

60

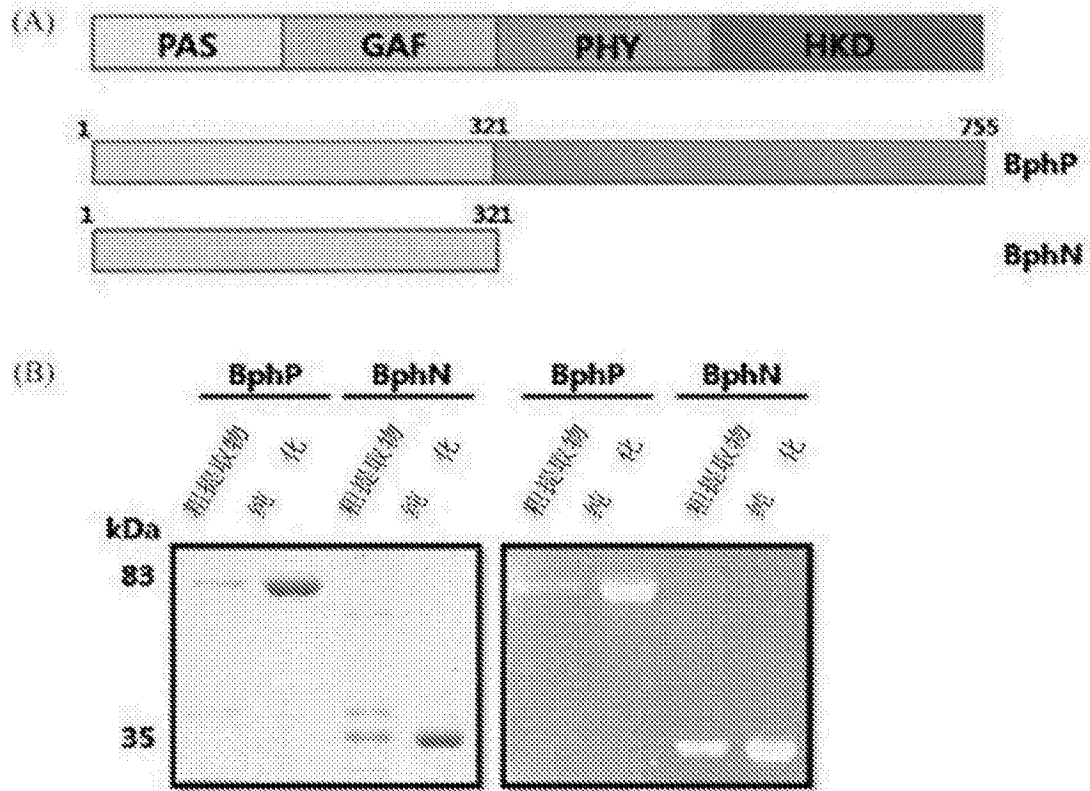


图1

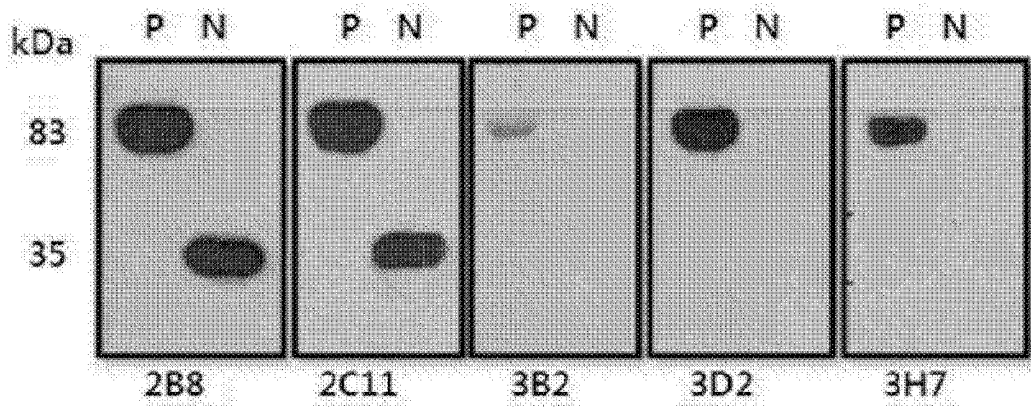


图2

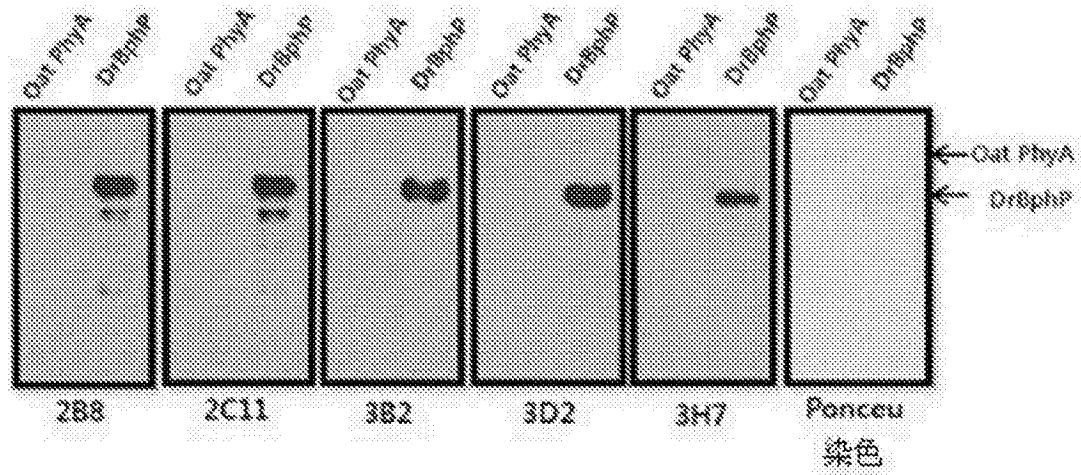


图3

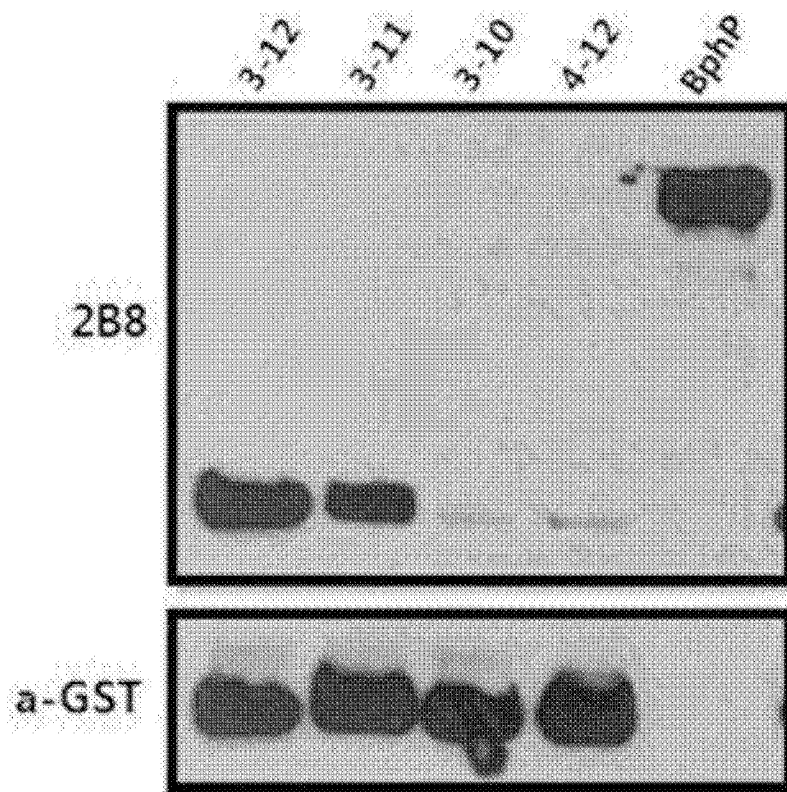


图4

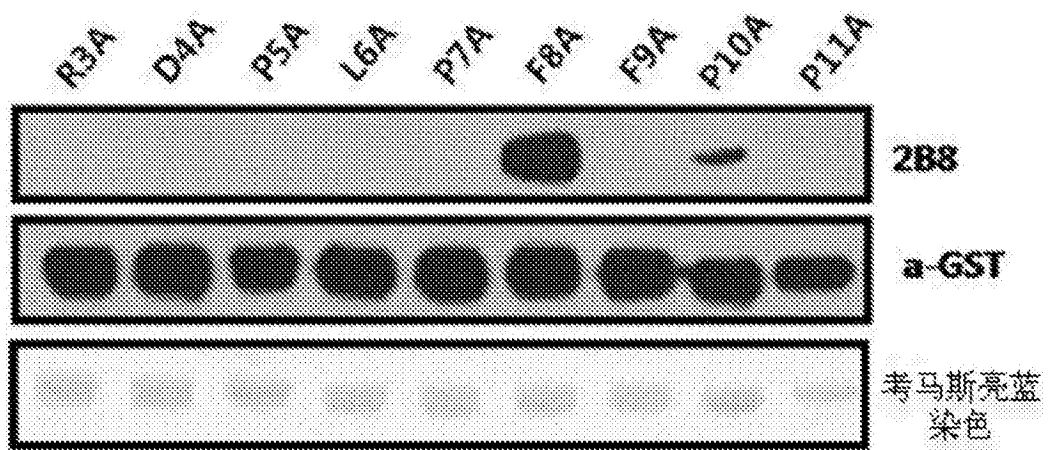


图5

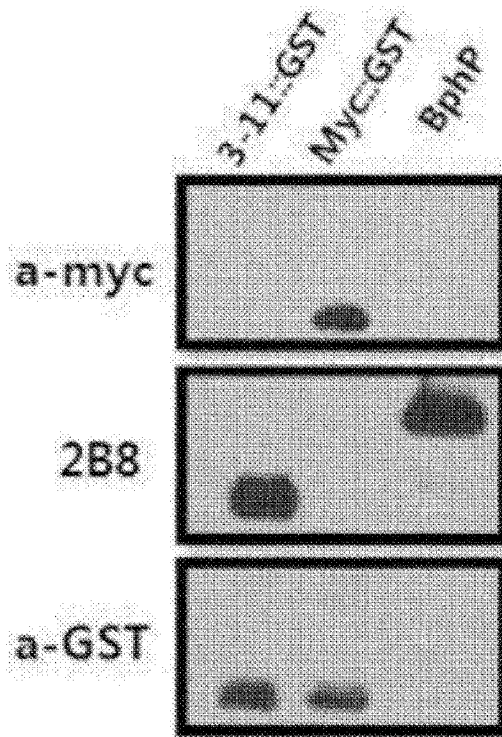


图6

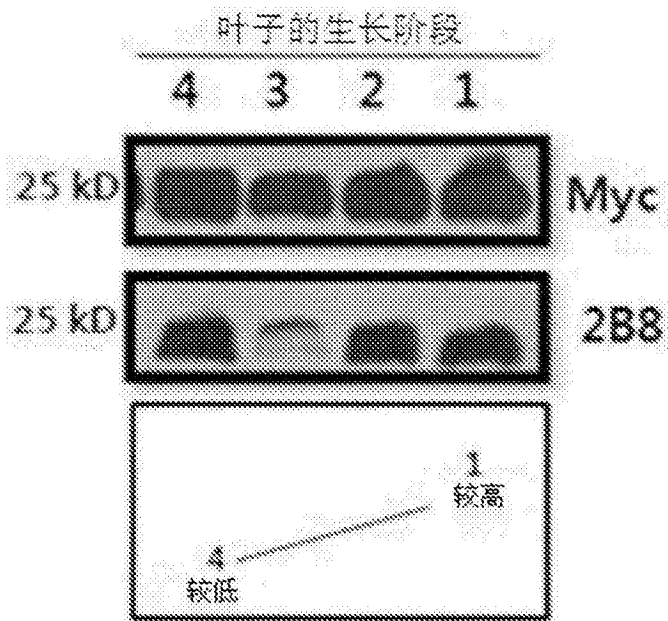


图7

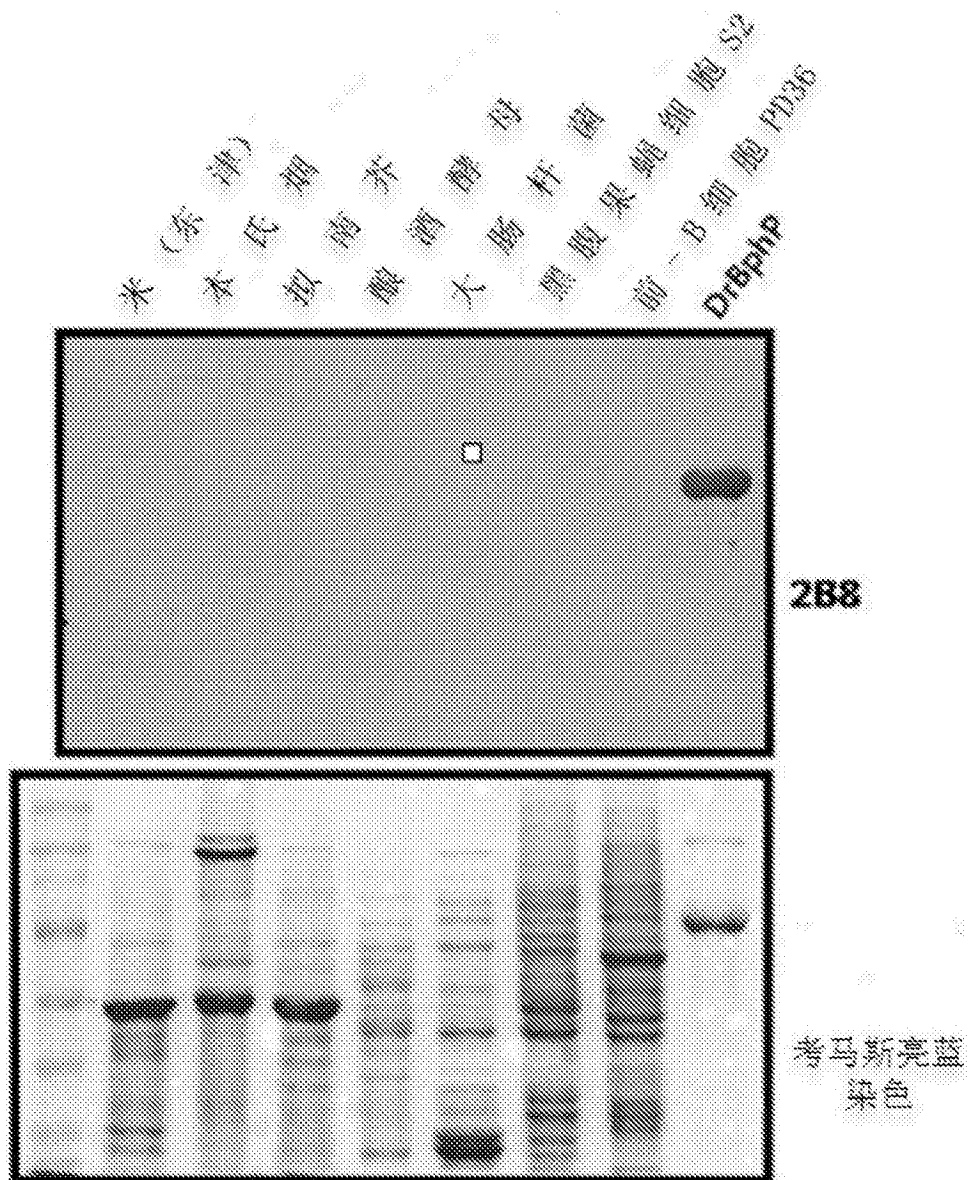


图8

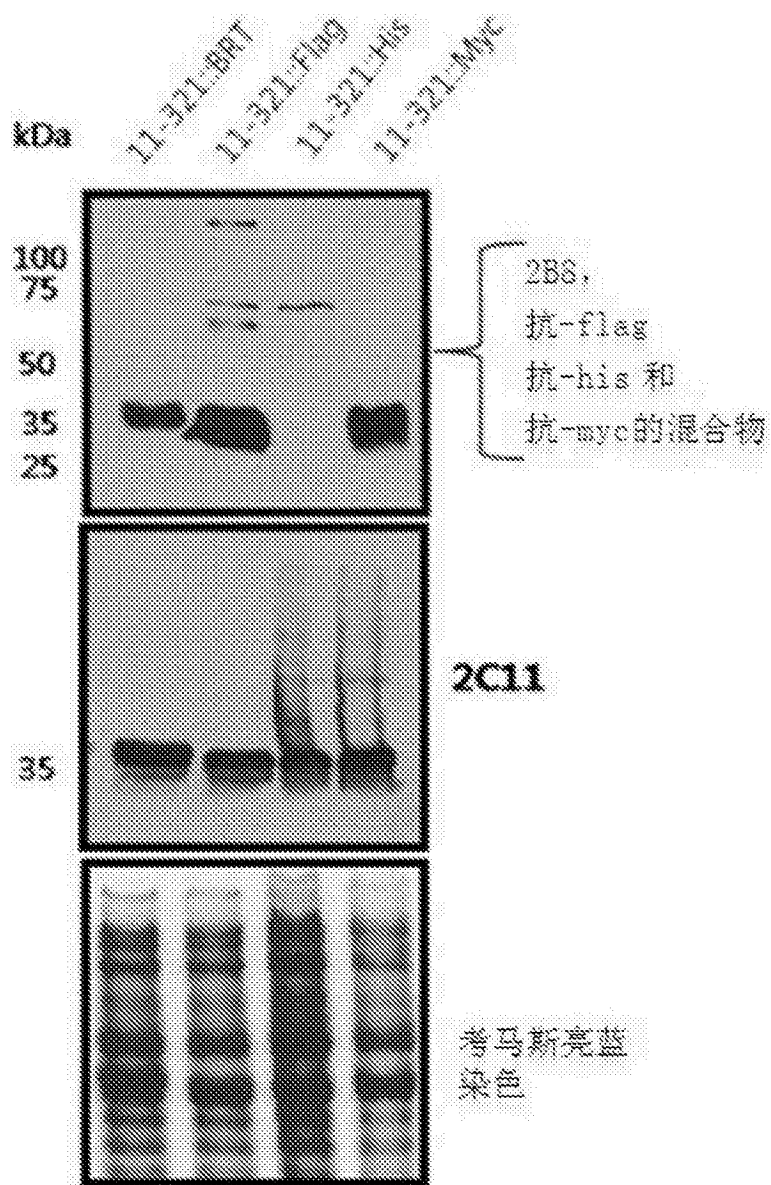


图9