



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113999861 B

(45) 授权公告日 2024.03.15

(21) 申请号 202111050778.X

C07K 16/06 (2006.01)

(22) 申请日 2021.09.08

C07K 1/22 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113999861 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2022.02.01

CN 112601454 A, 2021.04.02

EP 3799568 A1, 2021.04.07

(73) 专利权人 三峡大学

US 2020231986 A1, 2020.07.23

地址 443002 湖北省宜昌市西陵区大学路8号

WO 2020067418 A1, 2020.04.02

Yu-Shan Tseng et al.. Generation and characterization of anti-Adeno-associated virus serotype 8 (AAV8) and anti-AAV9 monoclonal antibodies.《Journal of Virological Methods》.2016,第236卷105-110.

(72) 发明人 吕亚丰 曹春雨 杨建林 李舒月 张浩

吕亚丰 等.人抗酶抑制因子-1的原核表达纯化及多克隆抗体的制备.《生物技术通报》.2017,第33卷(第3期),193-198.

(74) 专利代理机构 宜昌市三峡专利事务所

42103

专利代理师 成钢

审查员 张娟

(51) Int. Cl.

C12N 15/35 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 14/015 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

腺相关病毒衣壳蛋白保守区多克隆抗体的制备方法及应用

表达的AAV衣壳蛋白。

(57) 摘要

本发明提供一种腺相关病毒衣壳蛋白保守区多克隆抗体的制备方法及应用,通过DNAMAN软件分析,将AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10衣壳蛋白氨基酸序列中连续7个及以上氨基酸同源的序列依次拼接,获得的序列即为AAV衣壳蛋白保守区序列,与保守区氨基酸序列对应可确定编码衣壳蛋白保守区的DNA序列,根据宿主菌的特性,对获得的DNA序列进行密码子优化,将优化后的DNA序列合成并构建到pET-30a原核表达载体,得到pET-30a-AAV-RC保守区蛋白质粒,DNA序列如SEQ ID NO.1,氨基酸序列如SEQ ID NO.2。成功制备了抗AAV衣壳蛋白保守区蛋白的多克隆抗体,识别所有血清型AAV,特异性识别和结合人真核细胞中转染

1. 一种腺相关病毒衣壳蛋白保守区的氨基酸序列,其特征在于,所述氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 采用权利要求1所述的腺相关病毒衣壳蛋白保守区的氨基酸序列制备抗腺相关病毒衣壳蛋白保守区的多克隆抗体的方法,其特征在于,

(1) AAV保守区蛋白原核表达

将如SEQ ID NO.1所示DNA序列构建到pET-30a原核表达载体中,得到pET-30a-AAV-RC保守区蛋白质粒,并将构建正确的重组pET-30a-AAV-RC保守区蛋白质粒导入大肠杆菌菌株BL21 (DE3)中,在含有卡拉霉素的琼脂平板筛选阳性克隆,挑取阳性克隆接种到含有卡拉霉素的LB液体培养基中,待菌液 OD 值达到0.8-1.0时,加入IPTG进行振荡培养,分别在 IPTG诱导后取样,离心,收集菌体并重悬于 PBS缓冲液中,超声裂解细菌后,离心,沉淀制样即为pET-30a/AAV保守区蛋白的BL21 (DE3)阳性单克隆菌;

(2) AAV保守区蛋白的纯化及复性

将pET-30a/AAV保守区蛋白的BL21 (DE3)阳性单克隆菌放大培养至菌液OD值达到0.8-1.0时,IPTG诱导表达后,离心收集菌体经高浓度尿素振荡裂解细菌,离心去除不溶性碎片,离心后将上清液置于超声条件下进行超声破碎细菌,使细菌充分裂解,最终收集上清,上清与Ni-NTA树脂杂交后上柱,洗脱得到目的蛋白,纯化后的蛋白用Ni-NTA亲和层析分离纯化上清中的重组蛋白,纯化后的重组蛋白经多次透析,透析后的蛋白即为AAV保守区蛋白,于-80℃保存备用;

(3) 兔多克隆抗血清制备

步骤(2)中的AAV保守区蛋白与弗氏完全佐剂乳化后对日本大耳朵白兔颈部脱毛后动脉注射进行一次启动免疫,两周后至少两次加强免疫,末次免疫后耳中动脉取血,离心收集血清,加入等体积甘油、1%叠氮钠后-20℃保存备用。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(1)及(2)中IPTG加入后控制浓度为1-1.5mmol/L;IPTG诱导时间为4-8h。

4. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(1)中PBS缓冲液由NaCl 137 mmol/L, KH_2PO_4 2 mmol/L, Na_2HPO_4 10 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L混合组成。

5. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(2)中高浓度尿素由8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L Na_2HPO_4 , 0.01 mol/L Tris-HCl组成,控制pH为 8.0-8.5;洗脱过程中的洗脱液由8 mol/L尿素,100 mmol/L Na_2HPO_4 , 10 mmol/L Tris,控制pH为 4-6.5,至少洗脱2次。

6. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(2)中透析次数为4次,透析过程中所用的透析液由尿素与透析缓冲溶液组成,其中,尿素浓度自5mol/L、2.5 mol/L、1 mol/L和0mol/L递减,透析缓冲溶液由50mmol/L Tris-HCL pH为7.5,250mmol/L NaCl,0.01mmol/L EDTA,1mol/L DTT组成。

7. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(3)中一次启动免疫过程中,AAV保守区蛋白先与弗氏完全佐剂乳化后,加入PBS缓冲液混合;

两周后开始加强免疫,所述的加强免疫采用AAV保守区蛋白与弗氏不完全佐剂乳化,颈部脱毛后动脉注射,做3次加强免疫,每次间隔时间两周。

8. 根据权利要求2-7任一项所述方法制备得到的抗腺相关病毒衣壳蛋白保守区的多克隆抗体在制备识别AAV2、AAV6或AAV9的药物中的应用。

9. 根据权利要求2-7任一项所述方法制备得到的抗腺相关病毒衣壳蛋白保守区的多克隆抗体在制备特异性识别或结合人真核细胞中转染表达的AAV2、AAV6或AAV9衣壳蛋白的药物中的应用。

腺相关病毒衣壳蛋白保守区多克隆抗体的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可识别腺相关病毒衣壳蛋白的抗体,具体为腺相关病毒衣壳蛋白保守区多克隆抗体的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 腺相关病毒(Adeno-associated Virus, AAV)属于细小病毒科依赖病毒属,该病毒在人类及灵长类等脊椎动物体内广泛存在,目前科学界普遍认为AAV不会引起人类疾病的产生。近年来国内外科平台将AAV载体用于体内基因治疗的临床试验数量逐步增加,其优异的安全性,以及针对靶向器官组织的高效转导性,使其成为针对体内基因治疗的首选载体系统。AAV病毒粒子直径约25nm,其中包裹着4.7kb的单链DNA基因组,基因组由 Rep基因和Cap基因组成,两侧是反向末端重复序列(inverted terminal repeats, ITR),左侧的ORF编码四种复制蛋白,根据它们的分子量命名为:Rep78、Rep68、Rep52和Rep40,右侧的ORF通过不同起始密码子编码三个衣壳蛋白VP1、VP2和VP3,这三种结构蛋白共用一个共同的羧基末端,但具有不同的氨基末端,AAV组装过程中,VP1、VP2和VP3以 1:1:10的比例形成二十面体病毒衣壳。

[0003] 目前市面上针对AAV衣壳蛋白的商业化抗体较少,并且大多抗体只能识别一种或几种血清型AAV,还没有能够同时结合所有血清型的AAV抗体。

发明内容

[0004] 针对上述技术问题,本发明根据AAV1-AAV10衣壳蛋白一级结构序列分析,共发现10处AAV衣壳保守区(Aa42-50, Aa93-101, Aa107-124, Aa 271-303, Aa 334-350, Aa 395-410, Aa 615-623, Aa 649-655, Aa669-698, Aa727-733),根据氨基酸序列确定DNA序列,将所有衣壳保守区DNA序列进行人工拼接,将DNA序列构建到pET-30a原核表达载体,得到pET-30a-AAV-RC保守区蛋白质粒,DNA序列如SEQ ID NO.1所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。经过原核蛋白表达纯化,以纯化的蛋白为抗原免疫日本大耳朵白兔,制备兔多克隆抗体,采用多种方式验证人工制备的抗原任然保留了抗原性,并且制备的抗体可识别所有血清型AAV衣壳蛋白,为后续研究AAV的生物学功能以及AAV载体的改造及优化奠定了基础。

[0005] 采用所述的腺相关病毒衣壳蛋白制备腺相关病毒衣壳蛋白保守区多克隆抗体的方法,包括如下步骤:

[0006] (1) AAV保守区蛋白原核表达

[0007] 将构建正确的重组pET-30a-AAV-RC保守区蛋白质粒导入大肠杆菌菌株BL21 (DE3)中,在含有卡拉霉素的琼脂平板筛选阳性克隆,挑取阳性克隆接种到含有卡拉霉素的LB液体培养基中,待菌液OD值达到0.8-1.0时,加入IPTG进行振荡培养,分别在IPTG诱导后取样,离心,收集菌体并重悬于PBS缓冲液中,超声裂解细菌后,离心,沉淀制样即为pET-30a/AAV保守区蛋白的BL21 (DE3)阳性单克隆菌;

[0008] 所述的IPTG加入后控制浓度为1-1.5mmol/L; IPTG诱导时间为4-8h。

[0009] 所述的PBS缓冲液由NaCl 137mmol/L, KH₂PO₄ 2mmol/L, Na₂HPO₄ 10mmol/L, KCl 2.7mmol/L混合组成。

[0010] (2) AAV保守区蛋白的纯化及复性

[0011] 将pET-30a/AAV保守区蛋白的BL21 (DE3) 阳性单克隆菌放大培养至菌液OD值达到0.8- 1.0时, IPTG诱导表达后, 离心收集菌体经高浓度尿素振荡裂解细菌, 离心去除不溶性碎片, 离心后将上清液置于超声条件下进行超声破碎细菌, 使细菌充分裂解, 最终收集上清, 上清与Ni-NTA树脂杂交后上柱, 洗脱得到目的蛋白, 纯化后的蛋白用Ni-NT亲和层析分离纯化上清中的重组蛋白, 纯化后的重组蛋白经多次透析, 透析后的蛋白即为AAV保守区蛋白, 于-80℃保存备用;

[0012] 所述的IPTG加入后控制浓度为1-1.5mmol/L; IPTG诱导时间为4-8h。

[0013] 高浓度尿素由8mol/L尿素, 0.1mol/L Na₂HPO₄, 0.01mol/L Tris-HCl组成, 控制pH为8.0-8.5; 洗脱过程中的洗脱液由8mol/L尿素, 100mmol/L Na₂HPO₄, 10mmol/L Tris, 控制pH为4-6.5, 至少洗脱2次, 其中第一次洗脱所使用的pH为6.3, 第二次为4.3。

[0014] 透析次数为4次, 透析过程中所用的透析液由尿素与透析缓冲溶液组成, 其中, 尿素浓度自5mol/L、2.5、1和0mol/L递减, 透析缓冲溶液由50mmol/L Tris-HCL pH为7.5, 250mmol/L NaCl, 0.01mmol/L EDTA, 1mol/L DTT组成。

[0015] (3) 兔多克隆抗血清制备

[0016] 步骤(2)中的AAV保守区蛋白与弗氏完全佐剂乳化后对日本大耳朵白兔颈部脱毛后动脉注射进行一次启动免疫, 两周后至少两次加强免疫, 末次免疫后耳中动脉取血, 离心收集血清, 加入等体积甘油、1%叠氮钠后-20℃保存备用。

[0017] 作为优选方案, 一次启动免疫过程中, AAV保守区蛋白先与弗氏完全佐剂乳化后, 加入PBS缓冲液混合;

[0018] 两周后开始加强免疫, 所述的加强免疫采用AAV保守区蛋白与弗氏不完全佐剂乳化, 颈部脱毛后动脉注射, 做3次加强免疫, 每次间隔时间两周。

[0019] 本发明的技术方案将所述的腺相关病毒衣壳蛋白保守区多克隆抗体在制备识别血清型AAV病毒的药物上的应用。

[0020] 或者腺相关病毒衣壳蛋白保守区多克隆抗体在制备特异性识别或结合人真核细胞中转染表达的AAV衣壳蛋白的药物上的应用。

[0021] AAV载体具有免疫原性低、很少或几乎不整合宿主基因组、可实现组织异性等特点, 目前AAV载体已逐渐成为体内基因治疗的主要载体。已有三种基于AAV载体的基因治疗药物上市, 分别是Glybera、Luxturna和Zolgensma。Glybera采用AAV1携带脂蛋白脂酶基因, 用于治疗遗传性脂蛋白酯酶缺乏的患者, 于2012年10月获得欧洲药品管理局批准上市; Luxturna采用AAV2将正常的RPE65基因导入患者体内, 用于治疗由RPE65基因突变导致的遗传性视网膜疾病, 于2017年12月获得美国食品药品监督管理局批准; Zolgensma 采用AAV9携带治疗基因SMN1, 用于治疗2岁以下的脊髓性肌肉萎缩症患者, 于2019年 5月经美国食品药品监督管理局批准上市。AAV载体的开发以及优化离不开AAV抗体的使用, 本研究旨在建立一种原核表达AAV衣壳蛋白保守区抗原肽的方法以及制备一种可识别所有血清型AAV病毒的多克隆抗体。

[0022] 为获得大量可用作抗原免疫日本大耳朵白兔的AAV保守区蛋白, 我们将构建的

pET-30a-AAV-CR原核表达质粒转化入大肠杆菌菌BL21 (DE3) 中。分析发现,细菌内 AAV保守区蛋白能被IPTG诱导性表达,且主要以包涵体的形式存在,这可能与AAV保守区蛋白诱导性表达的速度过快和细菌内浓度过高有关。由于重组AAV保守区蛋白带有His 标签,我们在尿素变性的条件下利用Ni-NTA树脂亲和层析法成功获得高纯度的AAV保守区蛋白。将纯化后的AAV保守区蛋白用做抗原免疫日本大耳朵白兔,经过1次启动免疫和 2次加强免疫后,获得高效价的抗AAV衣壳保守区蛋白多克隆抗体。该抗体能特异性识别和结合人真核细胞中转染表达的AAV衣壳蛋白,可有效用于各类血清型AAV衣壳蛋白的免疫印迹、ELISA、细胞免疫荧光等分析实验。

[0023] 综上所述,本实验成功建立了AAV衣壳保守区蛋白的原核表达纯化技术,成功制备了抗AAV衣壳保守区蛋白的多克隆抗体,制备的抗体上可识别所有血清型AAV,上述研究有助于后续AAV载体的改造、AAV筛选、AAV检测以及AAV生物学功能等研究。

附图说明

[0024] 图1重组质粒pET-30a-AAV-CR构建图。

[0025] 图2为SDS-PAGE分析AAV保守区蛋白的诱导表达电泳图,M:标准蛋白marker;1: IPTG诱导0h;2: IPTG诱导2h;3: IPTG诱导4h;4: IPTG诱导6h;5: IPTG诱导8h。箭头指示AAV保守区蛋白所在的位置。

[0026] 图3为SDS-PAGE分析AAV蛋白的纯化图电泳图,M:标准蛋白marker-441; 1: IPTG诱导0h全菌;2: IPTG诱导6h全菌;3: Ni-NTA树脂亲和层析纯化后的纯化蛋白。箭头指示AAV保守区蛋白所在的位置。

[0027] 图4为Western blotting分析AAV蛋白的纯化电泳图,1: IPTG诱导0h;2: Ni-NTA树脂亲和层析纯化后的纯化蛋白。箭头指示AAV保守区蛋白所在的位置。

[0028] 图5为ELISA分析制备血清的效价。

[0029] 图6为制备抗体用于AAV病毒的Western blotting的鉴定电泳图,1:纯化后AAV9病毒;2:纯化后AAV2病毒;3:纯化后AAV6病毒。

[0030] 图7为×200倍电镜下,细胞免疫荧光检测4T1细胞内VP1蛋白的表达。

具体实施方案

[0031] 本发明所使用的试剂如下

[0032] 大肠杆菌菌株BL21 (DE3) 购自北京全式金生物技术有限公司。

[0033] 日本大耳白兔(雄性)购自湖北省实验动物研究中心。

[0034] Ni-NTA蛋白纯化树脂,羊抗兔IgG-His抗体、HRP标记的羊抗兔IgG由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

[0035] DyLight® 594荧光二抗、ECL显色液为美国Thermo Scientific公司产品。

[0036] Ni-NTA树脂为德国Novagen公司产品。

[0037] 弗氏不完全佐剂和弗式完全佐剂为购自美国Sigma-aldrich公司,其它化学试剂由美国Sigma等公司提供。

[0038] 实施例1

[0039] AAV衣壳保守区蛋白序列获得

[0040] 从NCBI网站下载获得AAV1-AAV10衣壳蛋白氨基酸序列,将序列导入软件DNAMAN,序列同源性比对分析,发现10处保守区(Aa42-50,Aa93-101,Aa107-124,Aa 271-303,Aa 334-350,Aa 395-410,Aa 615-623,Aa 649-655,Aa669-698,Aa727-733),将保守区序列进行拼接,获得的序列即为AAV1-AAV10衣壳蛋白保守区序列,根据氨基酸序列确定DNA序列,对获得的DNA序列由金唯智生物公司合成并构建到pET-30a原核表达载体,5'末端酶切位点为XhoI,3'末端酶切位点为NdeI。

[0041] 通过DNAMAN软件比对AAV1-AAV10衣壳蛋白氨基酸序列,序列同源性比对分析发现10处保守区,将保守区序列进行依次拼接,获得的序列即为AAV衣壳蛋白保守区序列,编码保守区的DNA序列由金唯智生物公司合成并构建到

[0042] pET-30a原核表达载体,质粒经DNA测序,证实质粒中插入序列正确,阅读框架对接无误(图1),DNA序列如SEQ ID NO.1所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0043] AAV保守区蛋白原核表达

[0044] 将构建正确的重组pET-30a-AAV-RC保守区蛋白质粒导入大肠杆菌菌株BL21(DE3)中,在含有卡拉霉素的琼脂平板筛选阳性克隆,挑取阳性克隆接种到4mL含有卡拉霉素的LB液体培养基中,待菌液OD值达到0.8-1.0时,加入IPTG(终浓度为1mmol/L)于37℃振荡培养,分别在IPTG诱导0h、2h、4h、6h和8h后取样,5000rpm离心3min,收集菌体并重悬于PBS中(NaCl 137mmol/L,KH₂PO₄ 2mmol/L,Na₂HPO₄ 10mmol/L,KCl 2.7mmol/L),超声裂解细菌后,11 000×g离心,分别取上清和沉淀制样,经SDS-PAGE分析AAV保守区蛋白的表达情况,由此确定最佳外源蛋白诱导表达条件。

[0045] AAV保守区蛋白的纯化及复性

[0046] 经过上述的诱导鉴定,将成功转化pET-30a/AAV保守区蛋白的BL21(DE3)阳性单克隆菌放大培养(1000mL培养液)。待菌液OD值达到0.8-1.0时,IPTG(终浓度为1mmol/L)诱导表达6h后,5000rpm离心5min收集菌体经高浓度尿素(8mol/L尿素,0.1mol/L Na₂HPO₄,0.01mol/L Tris-HCl,pH 8.0)裂解细菌,37℃振荡裂解1h,离心30min去除不溶性碎片。离心后将上清液置于超声条件下进行超声破碎细菌,使细菌充分裂解,最终收集上清。上清与Ni-NTA树脂杂交2h后上柱,用洗脱液A(8mol/L尿素,100mmol/L Na₂HPO₄,10mmol/L Tris,pH6.3)洗脱杂蛋白,再用洗脱液B(8mol/L尿素,100 mmol/LNa₂HPO₄,10mmol/L Tris,pH4.3)洗脱目的蛋白。纯化后的蛋白用Ni-NT亲和层析分离纯化上清中的重组蛋白。纯化后的重组蛋白经尿素浓度梯度递减的透析液,分步透析去除尿素而复性。透析缓冲溶液为50mmol/L Tris-HCL(pH为7.5)250mmol/L NaCl 0.01mmol/L EDTA 1mol/L DTT其中尿素浓度梯度下降,其含量分别为5、2.5、1和0mol/L(各透析12h)透析后的蛋白于-80℃保存备用。

[0047] 将重组pET30a-AAV-CR保守区蛋白质粒转化入大肠杆菌BL21(DE3)中,IPTG终浓度为1mmol/L诱导0-8h,每间隔2h进行取样,经过15%的SDS-PAGE分析,结果(图2)显示IPTG诱导后,在相对分子质量17kD附近有一新蛋白产生,与预期AAV保守区蛋白重组蛋白的相对分子质量一致,诱导6h时重组蛋白的表达量最高。超声裂解细菌后,由于诱导表达的AAV保守区蛋白带有6×His标签,实验采用Ni-NTA亲和层析法对表达菌中的AAV保守区蛋白进行纯化,纯化后的蛋白经不同浓度的尿素透析缓冲液复性后,使用SDS-PAGE和Western blotting(抗His标签抗体作为一抗)对其进行纯度和特异性鉴定。结果显示,大肠杆菌中诱

导表达的AAV保守区蛋白能被Ni-NTA高效纯化(图3),His标签抗体可识别AAV衣壳蛋白保守区N端所带的His标签,说明本实验中纯化的蛋白为AAV保守区蛋白(图4)。

[0048] 兔多克隆抗血清制备

[0049] 纯化后的AAV保守区蛋白用作抗原免疫日本大耳朵白兔,首次免疫取600 μ g(480 μ L蛋白抗原与520 μ L佐剂乳化,并加入1mL PBS)抗原与弗氏完全佐剂乳化后,颈部脱毛后动脉注射。注射前,分别从日本大耳朵白兔里取2mL动脉血清,作为后续实验阴性对照。两周后做3次加强免疫,每次间隔时间两周,加强免疫采用AAV保守区蛋白与弗氏不完全佐剂乳化,颈部脱毛后动脉注射。末次免疫后耳中动脉取血,4 $^{\circ}$ C静置1h后,4 $^{\circ}$ C, 12000r/min离心收集血清,加入等体积甘油、1%叠氮钠后-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0050] 实施例2

[0051] 采用实施例1制备得到的多克隆抗体效价检测

[0052] 间接ELISA法被用于检测本研究制备的抗血清中AAV保守区蛋白单克隆抗体效价。将纯化的AAV保守区蛋白用包被缓冲液(PH为9.6的碳酸盐溶液)稀释至终浓度为10 μ g/mL后,加入96孔酶标板,每孔100 μ L,置于4 $^{\circ}$ C包被16h,3%的BSA于37 $^{\circ}$ C封闭2h,减少非特异性结合,然后加入系列稀释的血清,100 μ L/孔,以未免疫日本大耳朵白兔血清为阴性对照,PBS为空白对照,37 $^{\circ}$ C孵育1h;再加入HRP标记的羊抗兔IgG(1:5000稀释),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h;TMB法显色,2mol/L硫酸终止反应后,酶标仪检测各孔A450值。以空白对照调零,待测孔A450值与阴性对照孔A450值的比值 ≥ 2.1 即判为阳性,以能获得阳性的最大稀释度作为待检血清的抗体效价。

[0053] 结果表面将纯化的AAV保守区蛋白用作抗原包被酶标板,免疫血清等比稀释后作为一抗,ELISA法检测抗血清的效价,结果显示(图5)纯化的AAV衣壳蛋白保守区抗原肽可在体内高效诱导抗体生成,其抗体效价可达到1:64000。

[0054] 实施例3

[0055] 采用Western bolt法鉴定实施例1制备得到的多克隆抗体以本实施例1制备的抗血清为一抗,Western bolt法检测多种血清型AAV,以验证本实验制备的AAV抗体。AAV2、AAV6、AAV9病毒样品经SDS-PAGE分离后以200mA恒电流转移到PVDF膜,膜采用含5%脱脂牛奶的TBST封闭2h。用本实验制备的AAV抗体为一抗(1:3000稀释)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,羊抗兔IgG为二抗室温孵育1h后使用TBST进行漂洗,ECL法显色并记录结果。

[0056] 结果表面,以纯化的AAV2、AAV6、AAV9为样品,以制备的AAV衣壳蛋白保守区抗体为一抗,Western blotting检测AAV抗体对不同血清型AAV的识别效果,结果(图6)表明,制备的AAV抗体能有效识别和结合不同的血清型AAV,可用于各种血清型AAV病毒相关的Western blot检测。

[0057] 实施例4

[0058] 细胞免疫荧光法鉴定实施例1制备得到的多克隆抗体

[0059] 将表达AAV2、AAV6、AAV9衣壳蛋白的质粒转染4T-1细胞,转染48h后将细胞接种于玻片继续培养,待细胞贴壁后,PBS洗涤3次,4%多聚甲醛室温固定细胞15min,0.5%的TritonX-100室温通透20min,PBS洗涤玻片3次后,正常山羊血清室温封闭30min,每张玻片滴加本实验制备的抗血清(1:200稀释)后放入湿盒,4 $^{\circ}$ C孵育过夜,PBS洗涤玻片后滴加荧光二抗(1:500稀释),湿盒中室温避光孵育1h,洗涤未结合的二抗后,滴加 DAPI(1:1000)避光

孵育10-15min(复染细胞核),PBS洗去多余的DAPI,用含有抗荧光淬灭剂的封片剂封片,荧光显微镜观测结果。

[0060] 试验结果表面在4T1细胞中转染AAV2、AAV6、AAV9衣壳蛋白质粒,以空载质粒为对照,以制备的AAV抗体为一抗, DyLight® 594荧光标记的羊抗兔IgG为二抗,免疫荧光法检测4T1细胞内不同血清型AAV衣壳蛋白。结果(图7)显示,制备抗体可检测到 AAV2、AAV6、AAV9衣壳蛋白,转染空载质粒组为检测到信号,说明制备的抗体理论上可用于各种血清型AAV的细胞免疫荧光分析。

[0061] 序列表

[0062] <110>三峡大学

[0063] <120>腺相关病毒衣壳蛋白保守区多克隆抗体的制备方法及应用

[0064] <130>

[0065] <160>2

[0066] <210>1

[0067] <211>427

[0068] <212>DNA

[0069] <213>AAV1-AAV10衣壳蛋白保守区的DNA序列

[0070] <400>1

[0071] AGATCTGCGCGCCTGGTGCTGCCGGGCTATTATAACCATGCGGATGCGGAATTTCAAGA TACGAGC
TTTGGCGCAACCTGGGCCGCGCGGTGTTTCAAGCGAAAAACGCAGCACC CCGTGGGGCTATTTTGATTTTAAAC
CGCTTTCATTGCCATTTTAGCCCGCGGATTGGCAGC GCCTGATTAACAACGCGAACAACCTGACGAGCACCTGC
CTGGAATATTTCCGAGTCAG ATGCTGCGCACCGGCAACAACCTTCAAGGCCCGATTGGGCGAAAATTCCGATT
AAAAA CACCCCGGTGCCGAGCTTTATTACGCAGTATAGCACCGCCAAGTGAGCGTGGAATTG AATGGGAACT
GCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTGGAACCCGAAATTGGCACCCGCTA TCTGACCCTCGAG

[0072] <210>2

[0073] <211>138

[0074] <212>氨基酸

[0075] <213>AAV1-AAV10的衣壳蛋白保守区氨基酸序列

[0076] <400>2

[0077] RGLVLPGYNHADAQDTSFGGNLGRAVFQAKKRSTPWGYFDFNRFHCHFSRQWRLI NNANNLT
STCLEYFPSQMLRTGNNFQGPWAKIPIKNTVPVPSFITQYSTGQVSVEIEWELQKE NSKRWNPEIGTRYLT。

- [0001] 序列表
- [0002] <110>三峡大学
- [0003] <120>腺相关病毒衣壳蛋白保守区多克隆抗体的制备方法及应用
- [0004] <130>
- [0005] <160> 2
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 427
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213>AAV1-AAV10的DNA序列
- [0010] <400> 1
- [0011] AGATCTGCGCGGCCTGGTGCTGCCGGGCTATTATAACCATGCGGATGCGGAATTTCAAGATACGAGCTT
TGGCGGCAACCTGGGCCGCGCGGTGTTTCAAGCGAAAAACGCAGCACCCCGTGGGGCTATTTTGATTTTAACCGCT
TTCATTGCCATTTTAGCCCGCGGATTGGCAGCGCCTGATTAACAACGCGAACCAACCTGACGAGCACCTGCCTGGAA
TATTTTCCGAGTCAGATGCTGCGCACCGGCAACAACCTTCAAGGCCGATTGGGCGAAAATTCCGATTAACAAACAC
CCCGGTGCCGAGCTTTATTACGCAGTATAGCACCGCCAAGTGAGCGTGGAAATTGAATGGGAAGTGCAGAAAGAAA
ACAGCAAACGCTGGAACCCGGAAATTGGCACCCGCTATCTGACCCTCGAG
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 138
- [0014] <212> 氨基酸
- [0015] <213>AAV1-AAV10的氨基酸序列
- [0016] <400> 2
- [0017] RGLVLPGYNHADAQDTSFGGNLGRAVFAQKKRSTPWGYFDNFHCHFSRQDWQRLINNANLST
CLEYFPSQMLRTGNNFQGPWAKIPIKNTVPVPSFITQYSTGQVSVIEWELQKENSQRWNPEIGTRYLT

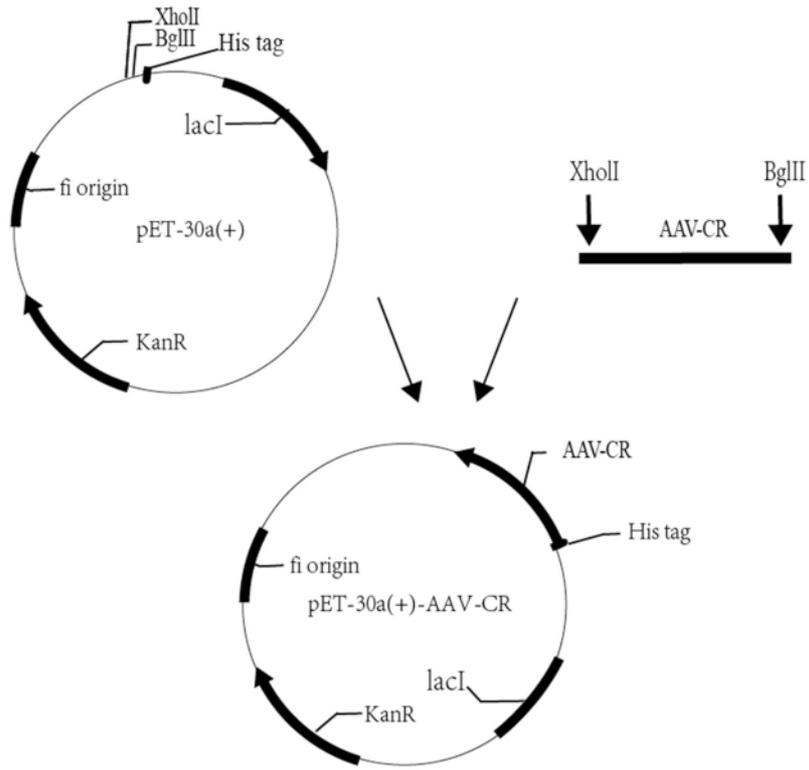


图1

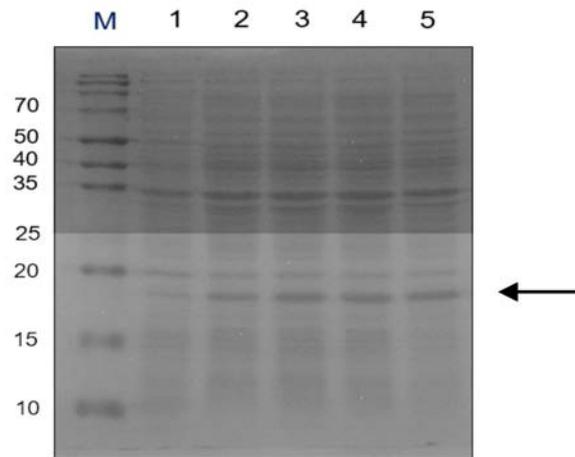


图2

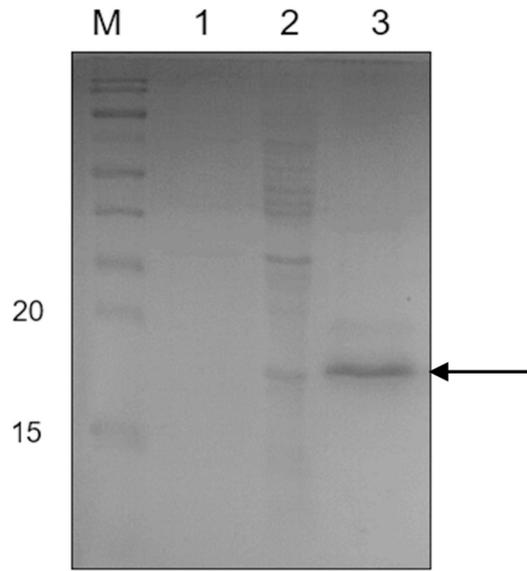


图3

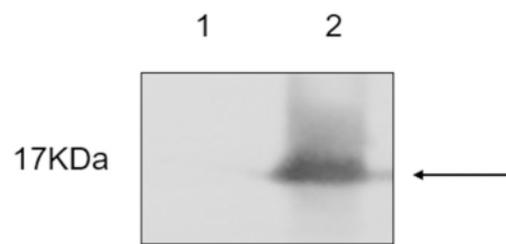


图4

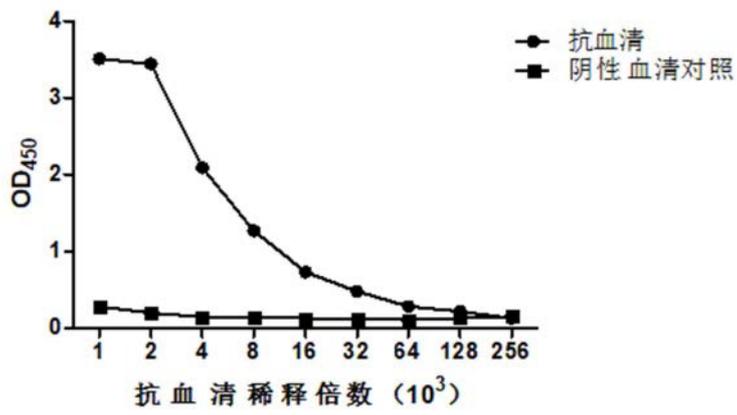


图5

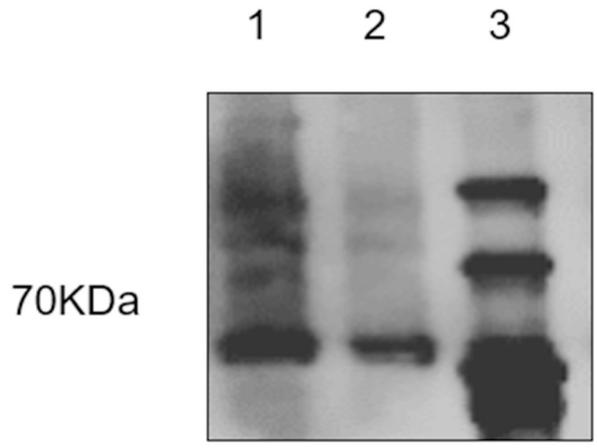


图6

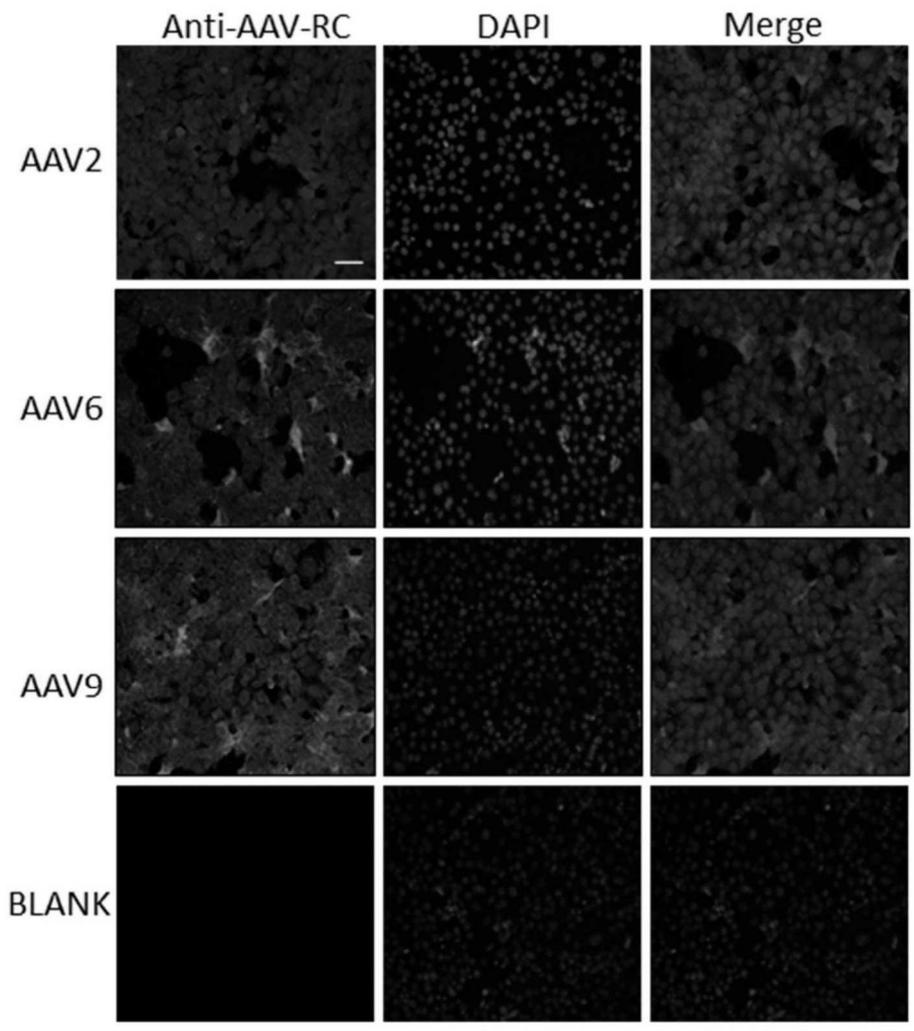


图7