



(21) 申请号 202311451400.X

G01N 33/68 (2006.01)

(22) 申请日 2023.10.31

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(71) 申请人 武汉爱博泰克生物科技有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开发
区高新二路388号武汉光谷国际生物
医药企业加速器1.1期7栋4层01室
(自贸区武汉片区)

(72) 发明人 余建敏 周雪莉 万梅音 熊章万
张福城(74) 专利代理机构 武汉蓝宝石专利代理事务所
(特殊普通合伙) 42242

专利代理师 张文静

(51) Int. Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

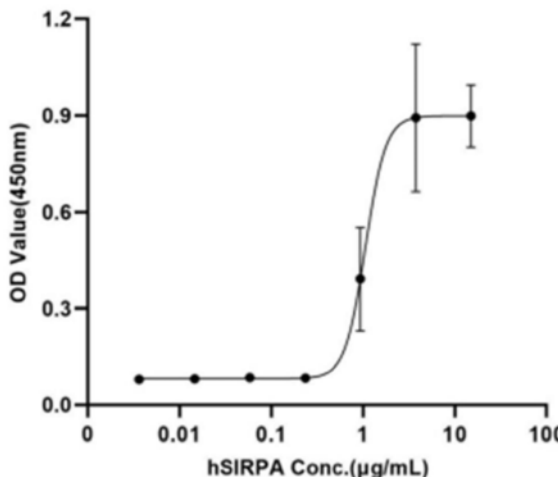
权利要求书1页 说明书6页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及蛋白表达纯化技术领域,具体涉及一种活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化及检测方法。该表达纯化方法包括以下步骤:S1,合成重组hSIRPA蛋白的基因序列并插入到pcDNA 3.4载体中,构建得到重组表达质粒hSIRPA-hFC-His,其中,重组hSIRPA蛋白的基因序列如SEQ ID NO: 1所示;S2,将构建得到的重组表达质粒hSIRPA-hFC-His转化到大肠杆菌感受态中,抽提得到无内毒素质粒hSIRPA-hFC-His;S3,将无内毒素质粒hSIRPA-hFC-His转染HEK293F细胞并在OPM-293CD05培养基中进行细胞培养以表达重组蛋白;S4,离心收集细胞,取上清,将上清采用Ni-NTA进行分离。该纯化方法可以纯化得到具有活性的双标签hSIRPA重组蛋白,并可采用OVCAR-3细胞进行活性检测,避免了使用普通实验室不容易获取的红细胞,且检测方法可靠准确。



1. 一种活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤S1,合成重组hSIRPA蛋白的基因序列并插入到pcDNA3.4载体中,构建得到重组表达质粒hSIRPA-hFC-His,其中,重组hSIRPA蛋白的基因序列如SEQ ID NO:1所示;

步骤S2,将构建得到的重组表达质粒hSIRPA-hFC-His转化到大肠杆菌感受态中,抽提得到无内毒素质粒hSIRPA-hFC-His;

步骤S3,将无内毒素质粒hSIRPA-hFC-His转染HEK293F细胞并在OPM-293CD05培养基中进行细胞培养以表达重组蛋白;

步骤S4,离心收集细胞,取上清,将上清采用Ni-NTA进行分离。

2. 根据权利要求1所述的活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化方法,其特征在于,步骤S1中,重组hSIRPA蛋白的基因序列插入到pcDNA 3.4载体的XbaI和AgeI酶切位点之间。

3. 根据权利要求1所述的活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化方法,其特征在于,步骤S2中的大肠杆菌感受态包括但不限于DH5 α 、TOP10。

4. 根据权利要求1所述的活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化方法,其特征在于,转染后细胞的培养条件是:125rpm,8%CO₂,37℃,湿度95%。

5. 根据权利要求1所述的活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化方法,其特征在于,步骤S3中的转染方法为:将重组表达质粒hSIRPA-hFC-His和转染试剂分别用Opti-MEM培养基稀释后,混匀,孵育后得PEIMAX-DNA复合物,将PEIMAX复合物添加到细胞密度为 3.0×10^6 /mL的HEK293F细胞中培养,转染后16~22h,向摇瓶中添加体积比为2~5%的293-ProFeed、2~4g/L葡萄糖和0.5~1.5mM丙戊酸钠,继续培养,当细胞活率低于70%时收获细胞。

6. 根据权利要求5所述的活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化方法,其特征在于,所述转染试剂为PEIMAX。

7. 根据权利要求1所述的活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化方法,其特征在于,步骤S4中分离纯化的方法梯度洗脱程序为:

洗脱缓冲液1:20mM Tris-HCl,250mM NaCl,40mM咪唑,10%甘油,pH 8.0;

洗脱缓冲液2:20mM Tris-HCl,250mM NaCl,80mM咪唑,10%甘油,pH 8.0;

洗脱缓冲液3:20mM Tris-HCl,250mM NaCl,250mM咪唑,10%甘油,pH 8.0;

洗脱缓冲液4:20mM Tris-HCl,250mM NaCl,500mM咪唑,10%甘油,pH 8.0。

8. 活性重组hSIRPA蛋白的检测方法,其特征在于,所述方法用于对权利要求1~7任一项纯化方法纯化得到的重组蛋白进行检测,包括以下步骤:

将hSIRPA蛋白稀释液分别包被在酶标板上,封闭液封闭处理后,加入 5×10^4 /孔的OVCAR-3细胞,孵育1~2h后,取出酶标板,弃细胞悬液并洗涤后,加入CCK8,继续孵育后,检测OD450,即得。

9. 根据权利要求8所述的活性重组hSIRPA蛋白的检测方法,其特征在于,所述hSIRPA蛋白稀释液由包被稀释液稀释至最大浓度为15 μ g/mL,所述包被稀释液为0.05M碳酸盐缓冲溶液。

10. 根据权利要求8所述的活性重组hSIRPA蛋白的检测方法,其特征在于,所述封闭液为体积占比为1%的牛血清白蛋白PBS缓冲液。

一种活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白表达纯化技术领域,具体涉及一种活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化及检测方法。

背景技术

[0002] hSIRPA (Swiss-Prot编号:P78324) 是一种酪氨酸蛋白磷酸酶非受体型底物I,又名SHPS1或CD172a,表达在细胞膜上,是一种单次跨膜蛋白,由504个氨基酸残基(aa)组成,其中1-30aa是信号肽,31-373aa是胞外区域,形成3个免疫球蛋白超家族结构域,374-394aa是跨膜区域,395-504aa是胞内区域,形成2个ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) 结构。hSIRPA蛋白在CD47/SIRPA活性检测、生物分析以及肿瘤治疗靶点的体外研究中具有重要意义,因此,能够满足多种方式活性检测(如BLI、ELISA、细胞功能检测)的hSIRPA蛋白具有重大应用价值。

[0003] 现有的hSIRPA蛋白通常通过单标签的方式获得并采用红细胞进行活性分析,其存在如下弊端:

[0004] (1) 单标签蛋白使用范围不及双标签蛋白广,但目前常规的双标签蛋白制备得到的蛋白存在活性低的问题;

[0005] (2) 活性分析时采用红细胞进行分析,红细胞在普通实验室不容易获取,使得其检测大多需要依赖其它平台,成本高且不方便。

发明内容

[0006] 基于此,本发明的目的在于提供一种活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化及检测方法,该纯化方法可以纯化得到活性较高的双标签hSIRPA重组蛋白,并采用OVCAR-3细胞进行活性检测,避免了使用普通实验室不容易获取的红细胞,且检测方法可靠准确。

[0007] 本发明的目的之一在于保护一种活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化方法,包括以下步骤:

[0008] 步骤S1,合成重组hSIRPA蛋白的基因序列并插入到pcDNA3.4载体中,构建得到重组表达质粒hSIRPA-hFC-His,其中,重组hSIRPA蛋白的基因序列如SEQ ID NO:1所示;

[0009] 步骤S2,将构建得到的重组表达质粒hSIRPA-hFC-His转化到大肠杆菌感受态中,抽提得到无内毒素质粒hSIRPA-hFC-His;

[0010] 步骤S3,将无内毒素质粒hSIRPA-hFC-His转染HEK293F细胞并在OPM-293CD05(购自上海奥浦迈生物科技有限公司,货号:81075-001)培养基中进行细胞培养以表达重组蛋白;

[0011] 步骤S4,离心收集细胞,取上清,将上清采用Ni-NTA进行分离。

[0012] 进一步,步骤S1中,重组hSIRPA蛋白的基因序列插入到pcDNA 3.4载体的XbaI和AgeI酶切位点之间。

[0013] 进一步,步骤S2中的大肠杆菌感受态包括但不限于DH5 α 、TOP10。

- [0014] 进一步,转染后细胞的培养条件是:125rpm,8%CO₂,37℃,湿度95%。
- [0015] 进一步,步骤S3中的转染方法为:将重组表达质粒hSIRPA-hFC-His和转染试剂分别用Opti-MEM培养基稀释后,混匀,孵育后得PEIMAX-DNA复合物,将PEIMAX复合物添加到细胞密度为 3.0×10^6 /mL的HEK293F细胞中培养,转染后16~22h,向摇瓶中添加体积比为2~5%的293-ProFeed、2~4g/L葡萄糖和0.5~1.5mM丙戊酸钠,继续培养,当细胞活率低于70%时收获细胞。
- [0016] 进一步,所述转染试剂为PEIMAX。
- [0017] 进一步,步骤S4中分离纯化的方法梯度洗脱程序为:
- [0018] 洗脱缓冲液1:20mM Tris-HCl,250mM NaCl,40mM咪唑,10%甘油,pH 8.0;
- [0019] 洗脱缓冲液2:20mM Tris-HCl,250mM NaCl,80mM咪唑,10%甘油,pH 8.0;
- [0020] 洗脱缓冲液3:20mM Tris-HCl,250mM NaCl,250mM咪唑,10%甘油,pH 8.0;
- [0021] 洗脱缓冲液4:20mM Tris-HCl,250mM NaCl,500mM咪唑,10%甘油,pH 8.0。
- [0022] 本发明的目的之二还在于保护上述活性重组hSIRPA蛋白的检测方法,包括以下步骤:
- [0023] 将hSIRPA蛋白稀释液分别包被在酶标板上,加入封闭液封闭处理后,加入 5×10^4 /孔的OVCAR-3细胞,孵育1~2h后,取出酶标板,弃细胞悬液并洗涤后,加入CCK8,继续孵育后,检测OD450,即得。
- [0024] 进一步,所述hSIRPA蛋白稀释液由包被稀释液稀释至最大浓度为15 μ g/mL,所述包被稀释液为0.05M碳酸盐缓冲溶液(Na₂CO₃ 1.59g,NaHCO₃2.94g,加蒸馏水定容至1000mL,pH=9.6)。
- [0025] 进一步,所述封闭液为体积占比为1%的牛血清白蛋白PBS缓冲液。
- [0026] 本发明所提供的活性重组hSIRPA蛋白的表达纯化方法,可以成功纯化得到有活性的双标签重组hSIRPA蛋白,经ELISA检测,其EC₅₀可达到22.34ng/mL,采用OVCAR-3细胞进行检测,其活性可达到ED₅₀为1.06 μ g/mL;采用OVCAR-3细胞进行活性检测,避免了使用普通实验室不容易获取的红细胞,且检测方法可靠准确。

附图说明

- [0027] 图1为实施例1中重组表达质粒pcDNA3.4(hSIPRA-hFC-His)的图谱;
- [0028] 图2为实施例2中hSIRPA蛋白组氨酸标签抗体鉴定WB图;
- [0029] 图3为实施例2中hSIRPA蛋白Ni-NTA亲和纯化SDS-PAGE胶图;
- [0030] 图4为实施例2中最终成品hSIRPA蛋白SDS-PAGE胶图;
- [0031] 图5为实施例3中OVCAR-3细胞检测hSIRPA粘附活性结果;
- [0032] 图6为实施例4中ELISA检测hSIRPA蛋白活性。

具体实施方式

[0033] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细说明,以使本领域的技术人员更加清楚地理解本发明。以下各实施例,仅用于说明本发明,但不止用来限制本发明的范围。基于本发明中的具体实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的情况下,所获得的其他所有实施例,都属于本发明的保护范围。

[0034] 文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。若无特殊说明，所有原料组分均为本领域技术人员熟知的市售产品，所用的技术方法均为本领域技术人员所熟知的常规技术方法。

[0035] 实施例1重组表达质粒的获得

[0036] (1) 基因克隆与载体构建

[0037] 设计重组hSIRPA蛋白的基因序列交由通用生物(安徽)股份有限公司(后续简称“安徽通用”)合成,并插入到载体pcDNA3.4(Invitrogen)中的XbaI和AgeI酶切位点之间,构建得到重组表达质粒pcDNA3.4(hSIPRA-hFC-His),以上过程均由安徽通用完成,质粒图谱如图1所示。

[0038] 其中,重组hSIRPA蛋白的基因序列中选用的为Human SIRPA蛋白(Gene ID: 140885)胞外氨基酸序列Glu31-Arg370,其C端添加hFC-His双标签序列,用于编码重组hSIRPA-hFC-His蛋白的基因序列为:GAGGAGGA GCTGCAGGTGATTCAGCCTGACAAGTCCGTGTTGGT TGCAGCTGGAGAGACAGCCACTCTGCGCTGCACTGCGACCTCTCTGATCCCTGTGGGGCCATCCAGTGGTTCAGAG GAGCTGGACCAGGCCGGGAATTAATCTACAA

[0039] TCAAAAAGAAGGCCACTTCCCCCGGGTAACAACCTGTTTCAGACCTCAC

[0040] AAAGAGAAACAACATGGACTTTTCCATCCGCATCGGTAACATCACCCC

[0041] AGCAGATGCCGGCACCTACTACTGTGTGAAGTTCCGGAAAGGGAGCCC

[0042] CGATGACGTGGAGTTTAAGTCTGGAGCAGGCACTGAGCTGTCTGTGCG

[0043] CGCCAAACCCTCTGCCCCGTGGTATCGGGCCCTGCGGCGAGGGCCAC

[0044] ACCTCAGCACACAGTGAGCTTCACCTGCGAGTCCCACGGCTTCTCACC

[0045] CAGAGACATCACCCCTGAAATGGTTCAAAAATGGGAATGAGCTCTCAGA

[0046] CTTCCAGACCAACGTGGACCCCGTAGGAGAGAGCGTGTCTTACAGCAT

[0047] CCACAGCACAGCCAAGGTGGTGTGACCCGCGAGGACGTTCACTCTC

[0048] AAGTCATCTGCGAGGTGGCCACGTCACCTTGCAGGGGGACCTCTTC

[0049] GTGGGACTGCCAACTTGTCTGAGACCATCCGAGTTCCACCCACCTTGG

[0050] AGGTTACTCAACAGCCCGTGAGGGCAGAGAACCAGGTGAATGTCACC

[0051] TGCCAGGTGAGGAAGTTCTACCCCCAGAGACTACAGCTGACCTGGTTG

[0052] GAGAATGGAAACGTGTCCCGACAGAAACGGCCTCAACCGTTACAGA

[0053] GAACAAGGATGGTACCTACAACCTGGATGAGCTGGCTCCTGGTGAATGT

[0054] ATCTGCCCACAGGGATGATGTGAAGCTCACCTGCCAGGTGGAGCATGA

[0055] CGGGCAGCCAGCGGTGAGCAAAAAGCCATGACCTGAAGGTCTCAGCCC

[0056] ACCCGAAGGAGCAGGGCTCAAATACCGCCGCTGAGAACACTGGATCT

[0057] AATGAACGGGAGAATCTGTACTTCCAGGGTATGGACCCCAAATCTTGT

[0058] GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGG

[0059] GGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCAT

[0060] GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA

[0061] CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG

[0062] TGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG

[0063] TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
 [0064] GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC
 [0065] CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
 [0066] AGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG
 [0067] TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
 [0068] TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
 [0069] CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC
 [0070] ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 [0071] CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAcacc
 accatcaccacat (SEQ ID NO:1)。

[0072] hSIRPA-hFC-His蛋白氨基酸序列如下:EEELQVIQPDKSVLVAAGETA TLRCTATSLIPVG
 PIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYVKFRKGGSPDDVEFKSGAGT
 ELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSRPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSHSTAKVV
 LTREDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGN
 VSRTETASTVTENKDGTYNWSWLLVNVSAHRDDVKLTQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGSN
 ERENLYFQGMDPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALH
 NYHTQKSLSLSPGKHHHHHHH (SEQ ID NO:2)。

[0073] (2) 质粒抽提

[0074] 将上述获得的重组表达质粒pcDNA3.4 (hSIPRA-hFC-His) 转化到大肠杆菌DH5 α 的
 感受态细胞中,得到单菌落,挑取单菌落至LB液体培养基中培养过夜,用无内毒素质粒抽提
 试剂盒抽提得到无内毒素pcDNA3.4 (hSIPRA-hFC-His) 质粒。

[0075] 实施例2活性重组hSIPRA蛋白的表达纯化方法

[0076] (1) 重组hSIPRA蛋白的表达(瞬时转染)

[0077] 将实施例1中得到的无内毒素pcDNA3.4 (hSIPRA-hFC-His) 质粒转染HEK293F细胞
 进行表达,具体步骤如下:

[0078] 1) 细胞培养:用OPM-293CD05培养基传代培养并扩增HEK293F细胞,转染前一天,按
 $1.5 \sim 1.8 \times 10^6$ /mL接种HEK293细胞,摇床培养过夜;

[0079] 2) 转染:测定细胞密度及活率,在细胞密度 $\geq 3 \times 10^6$ /mL,细胞活率 $\geq 95\%$ 时进行
 转染(如果细胞密度过高,使用新鲜OPM-293CD05培养基将细胞密度调至 3.0×10^6 /mL,体积
 调节为25.5mL);

[0080] 3) 用1.5mL Opti-MEM培养基稀释30 μ g质粒DNA,混匀;

[0081] 4) 用1.5mL Opti-MEM培养基稀释75 μ L PEIMAX(1mg/mL,pH 7.1),混匀;

[0082] 5) 将稀释后的PRIMAX加到稀释后的质粒DNA中,混匀后在室温下孵育约20分钟;

[0083] 6) 将PEIMAX-DNA复合物缓慢添加至细胞摇瓶中,在添加过程中轻轻摇动摇瓶;

[0084] 7) 将摇瓶放置摇床培养箱中培养,培养条件:125rpm,8%CO₂,37 $^{\circ}$ C,湿度95%;

[0085] 8) 转染后16~22h向摇瓶中添加3% (v/v) 补料OPM-293ProFeed(购自上海奥浦迈
 生物科技有限公司,货号:F081918-001)、3g/L葡萄糖和1mM VPA(丙戊酸钠),在添加过程中

轻轻晃动摇瓶,将摇瓶放回37℃培养箱;

[0086] 9) 转染后连续3天测定细胞活率,当细胞活率低于70%时收获细胞,并进行hSIRPA蛋白的纯化。

[0087] (2) 重组hSIRPA蛋白的WB检测

[0088] 收集细胞后,3000rpm离心15min收集上清,取10 μ L上清制样,再用常规方法进行WB检测。WB检测结果如图2所示,表明培养基上清有重组hSIRPA蛋白表达。

[0089] (3) 重组hSIRPA蛋白的纯化

[0090] 在完成hSIRPA蛋白的WB检测后,即进行蛋白纯化步骤,具体如下:

[0091] 1) 取0.5mL Ni-NTABeads,加入3mL平衡缓冲液(20mM Tris-HCl,250mM NaCl,10mM咪唑,10%甘油pH 8.0),重复3次,5min/次;

[0092] 2) 在培养基上清(总体积约60mL)中加入平衡后的Ni-NTA Beads,4℃孵育过夜;

[0093] 3) 次日,将孵育后的培养基上清加入到亲和层析柱空柱中进行重力流过柱,在即将流穿时加入10mL冲洗缓冲液(20mM Tris-HCl,250mM NaCl,10mM咪唑,10%甘油,pH 8.0)洗涤1次;

[0094] 4) 梯度洗脱1,在冲洗缓冲液即将流穿时,加入500 μ L \times 2次洗脱缓冲液1(20mM Tris-HCl,250mM NaCl,40mM咪唑,10%甘油,pH 8.0),收集流穿液,并用G250检测(无明显颜色反应);

[0095] 5) 梯度洗脱2,加入500 μ L \times 3次洗脱缓冲液2(20mM Tris-HCl,250mM NaCl,80mM咪唑,10%甘油,pH 8.0),收集流穿液,并用G250检测(有明显颜色反应);

[0096] 6) 梯度洗脱3,加入500 μ L \times 2次洗脱缓冲液3(20mM Tris-HCl,250mM NaCl,250mM咪唑,10%甘油,pH 8.0),收集流穿液,并用G250检测(有明显颜色反应);

[0097] 7) 梯度洗脱4,加入500 μ L \times 2次洗脱缓冲液4(20mM Tris-HCl,250mM NaCl,500mM咪唑,10%甘油,pH 8.0),收集流穿液,并用G250检测(无明显颜色反应);

[0098] 8) 取以上步骤的流穿液制样进行SDS-PAGE电泳,结果如图3所示,结果表明在洗脱2、3、4中有较多目的蛋白;

[0099] 9) 混合步骤5、6、7的洗脱液,用30kDa超滤管离心(6850rpm,15min,4℃)换液,每次加入约5ml换液buffer(PBS,pH 7.4),离心换液3次,收集蛋白;

[0100] 10) 取步骤9样品制样进行SDS-PAGE电泳,结果如图4所示,目的蛋白大小约100kDa,蛋白纯度>90%。

[0101] 实施例3hSIRPA蛋白的活性检测方法

[0102] 使用RPMI 1640+20%胎牛血清(FBS)+0.01mg/mL重组人胰岛素(rhInsulin,购自武汉尚恩生物技术有限公司,货号SNCF-H001)培养OVCAR-3细胞,细胞活率大于90%时可以用于实验。具体方法如下:

[0103] 1) 包被:使用无菌水溶解蛋白,测定浓度后,用包被液(0.05M碳酸盐缓冲溶液(Na₂CO₃ 1.59g,NaHCO₃ 2.94g,加蒸馏水定容至1000mL,pH=9.6))梯度稀释hSIRPA蛋白,最大浓度为15 μ g/mL,4倍稀释,8个浓度点(含0浓度),2个复孔,每孔取100 μ L至酶标板,贴上贴膜,4℃包被过夜;

[0104] 2) 封闭:取出酶标板,弃包被液,加入200 μ L封闭液(1%牛血清白蛋白BSA用PBS配制),37℃培养箱封闭2h;

[0105] 3) 加细胞:收集细胞,用培养基(RPMI 1640+0.1%BSA)重悬细胞,并调整细胞密度至 5×10^5 /mL;取出酶标板,弃封闭液,用PBS洗涤2次,200 μ L/孔,每孔加入100 μ L(5×10^4 cells/孔)细胞悬液,37 $^{\circ}$ C培养箱孵育1.5h;

[0106] 4) 加CCK8:取出酶标板,弃细胞悬液,用PBS洗涤1次,200 μ L/孔,每孔加入100 μ L RPMI 1640(含10% CCK8),37 $^{\circ}$ C培养箱孵育1.5h后,使用酶标仪检测OD₄₅₀(参比波长630nm);

[0107] 5) 数据分析,实验结果如图5所示,结果表明ED50为1.06 μ g/mL。

[0108] 实施例4ELISA检测方法及其结果

[0109] 1) 使用无菌水溶解Human CD47蛋白(来源:ABclonal;货号:RP01306)和Human SIRPA蛋白,配制为400 μ g/ml的储备液;

[0110] 2) 包被:使用碳酸盐缓冲液(Na₂CO₃ 1.59g,NaHCO₃ 2.94g,加蒸馏水定容至1000mL,pH=9.6)配制2 μ g/mL Human CD47蛋白溶液,每孔加入100 μ l至酶标板,放入4 $^{\circ}$ C冰箱包被过夜;

[0111] 3) 封闭:取出包被板,弃包被液,加入200 μ l封闭液(1%牛血清白蛋白BSA用PBS配制),放置37 $^{\circ}$ C恒温箱封闭1.5小时,取出酶标板,用洗涤液(20 \times :160g NaCl,72.4g Na₂HPO₄·12H₂O,4.8g KH₂PO₄,4g KCl 10mL Tween-20加水溶解,定容到1000mL,调pH7.2-7.4,过滤(0.45 μ m))洗涤酶标板3次,300 μ l/孔,然后烘干1小时备用;

[0112] 4) 加入反应蛋白:使用蛋白稀释液(10g BSA,0.5mL Tween-20,1mL Proclin300用1 \times PBS溶解,定容到1000mL,过滤(0.45 μ m))稀释反应蛋白Human SIRPA(最大浓度1 μ g/mL,2倍稀释),分别取100 μ l至酶标板,37 $^{\circ}$ C恒温箱放置2小时;

[0113] 5) 二抗:取出酶标板,洗涤液洗涤3次,按1:10000稀释HRP Goat Anti-Human IgG(H+L)Ab(来源Jackson,货号:109-035-088),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C恒温箱放置1小时;

[0114] 6) 显色:取出酶标板,洗涤液洗涤3次,加入显色液TMB,100 μ l/孔,避光显色5min-25min左右(<30min);

[0115] 7) 终止:向酶标板中加入终止液50 μ l/孔,然后使用酶标仪检测OD_{450nm}(参比OD_{630nm});

[0116] 8) 数据分析:实验结果如图6所示,EC₅₀为22.34ng/mL,表明hSIRPA蛋白具有较高活性。

[0117] 在此有必要指出的是,以上实施例仅限于对本发明的技术方案做进一步的阐述和说明,并不是对本发明的技术方案的进一步的限制,本发明的方法仅为较佳的实施方案,并非用于限定本发明的保护范围。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

Created with SnapGene®

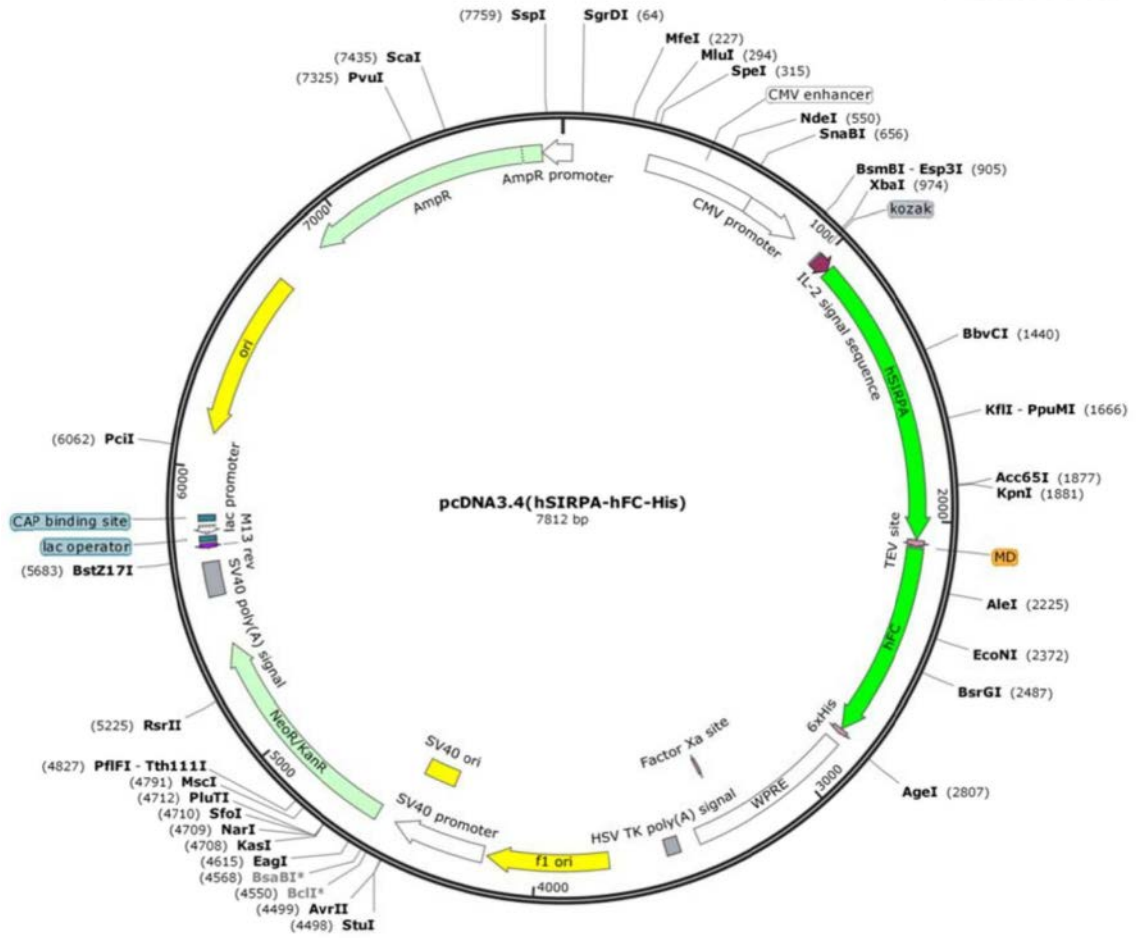


图1

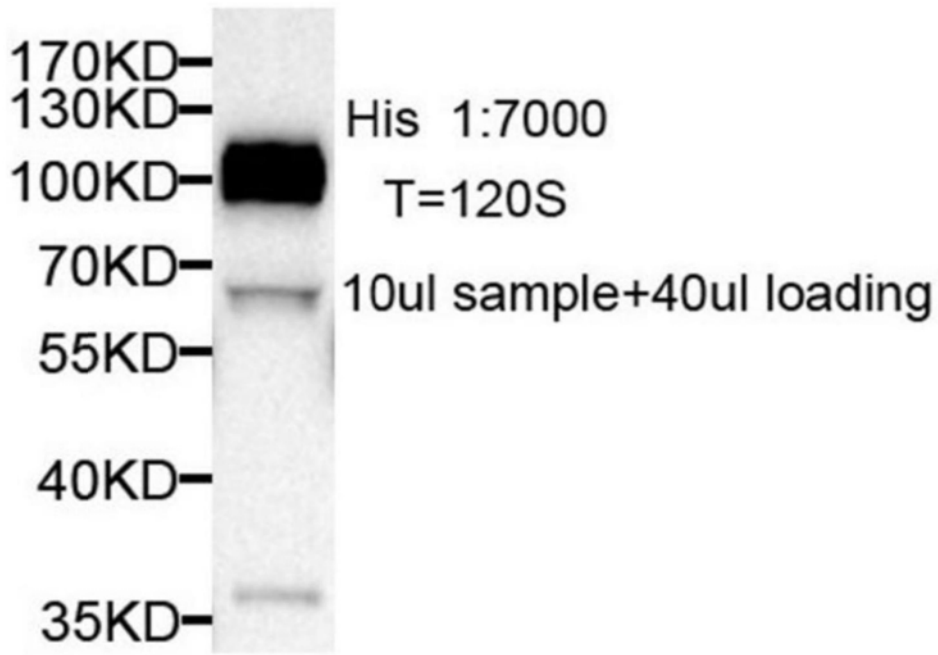


图2

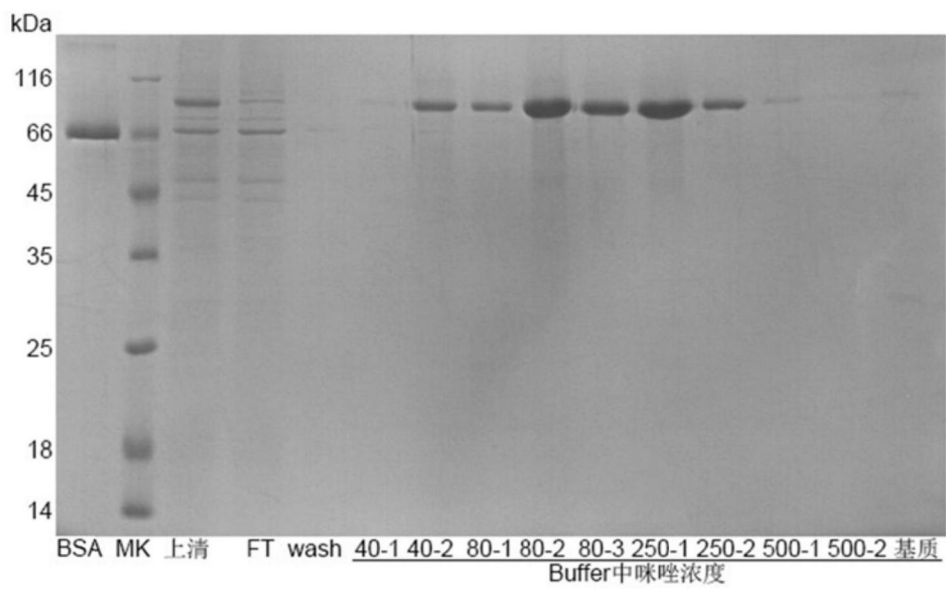


图3

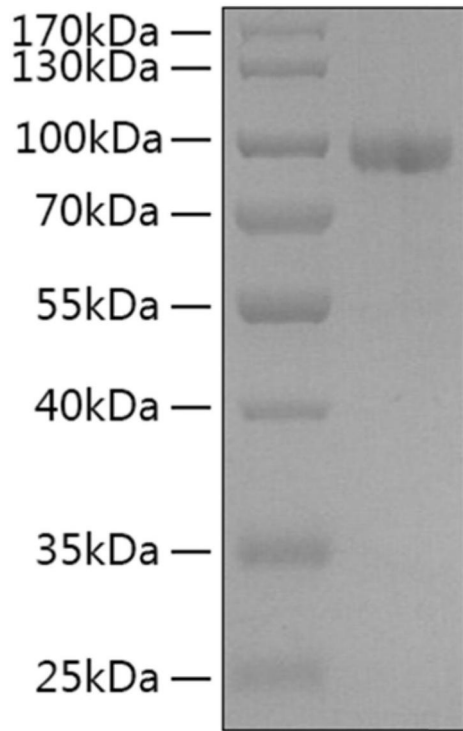


图4

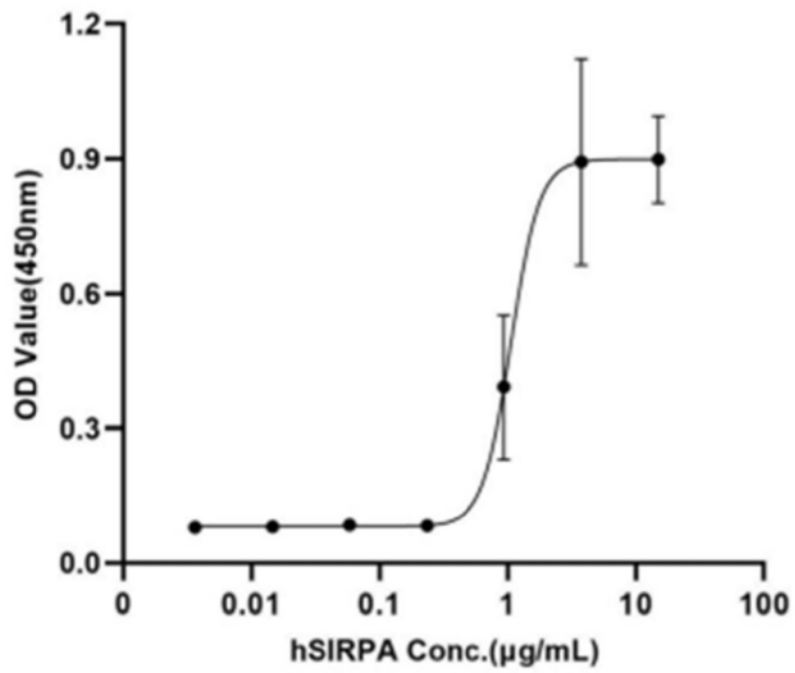


图5

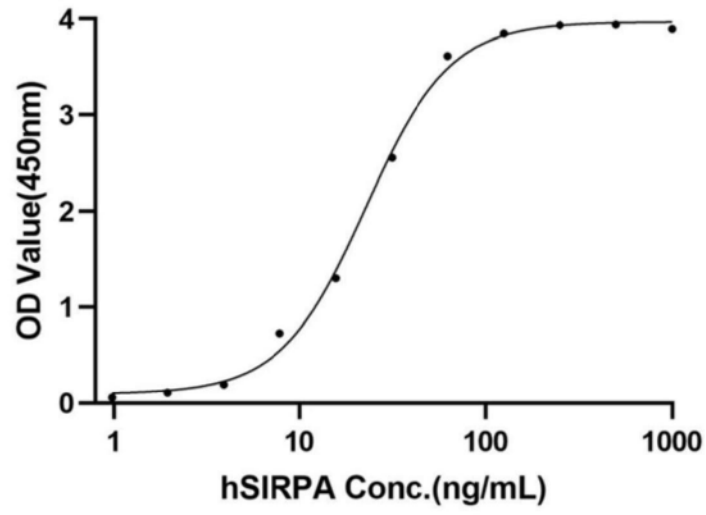


图6