



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101717448 A

(43) 申请公布日 2010.06.02

(21) 申请号 200910223819.3

(22) 申请日 2009.11.23

(71) 申请人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京钟灵街 50 号

(72) 发明人 刘贤进 温爽 张晓 刘媛

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限

公司 32200

代理人 李纪昌

(51) Int. Cl.

C07K 16/44 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

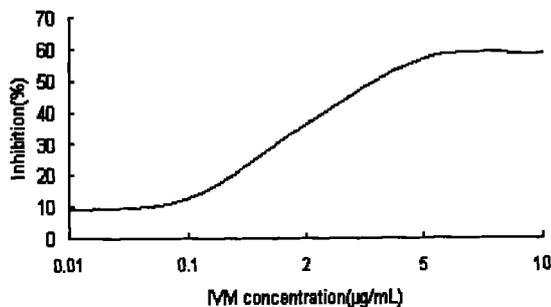
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

(54) 发明名称

伊维菌素的单链抗体 hsIVM8 及其制备方法、其在免疫学检测的应用

(57) 摘要

本发明涉及抗体,具体涉及一种伊维菌素的单链抗体 hsIVM8 及其制备方法、在免疫学检测的应用;本发明为以伊维菌素-牛血清白蛋白结合物为包被抗原包被免疫管,通过固相抗原筛选法从人源噬菌体抗体库 Tomlinson J 中筛选展示伊维菌素单链抗体的噬菌体,用单克隆 ELISA 法筛选阳性噬菌体,将阳性噬菌体感染大肠杆菌 HB2151 进行可溶性抗体的表达,对单链抗体 hsIVM8 进行纯化,获得伊维菌素的单链抗体 hsIVM8。本发明的优点在于:国内外首次报道了伊维菌素的单链抗体 hsIVM8 制备与免疫学检测方法,与现有的获得抗体的途径相比,该制备方法具有简单、快速、成本低等优点。



1. 一种伊维菌素的单链抗体 hsIVM8, 其核酸序列为 Seq NO. 1。

2. 一种伊维菌素的单链抗体 hsIVM8, 其氨基酸序列为 Seq NO. 2。

3. 一种伊维菌素的单链抗体 hsIVM8 的制备, 其特征在于: 以伊维菌素-牛血清白蛋白结合物为包被抗原包被免疫管, 通过固相抗原筛选法从人源噬菌体抗体库 Tomlinson J 中筛选展示伊维菌素单链抗体的噬菌体, 用单克隆 ELISA 法筛选阳性噬菌体, 将阳性噬菌体感染大肠杆菌 HB2151 进行可溶性抗体的表达, 对单链抗体进行纯化, 获得伊维菌素的单链抗体 hsIVM8。

4. 一种单链抗体 hsIVM8 在伊维菌素间接竞争 ELISA 检测方法的应用, 其特征在于如下步骤:

A、间接非竞争 ELISA 法测定单链抗体 hsIVM8 的工作浓度及效价: 选择 OD 值为 1.0 时的抗原抗体稀释浓度作为包被抗原、抗体工作浓度, 以 $A_{\text{阳}450}/A_{\text{阴}450} > 2.1$ 的最大稀释倍数作为抗体的最终效价;

B、将伊维菌素标准品和待测样品分别与两倍工作浓度的单链抗体 hsIVM8 等体积混合过夜, 所述的伊维菌素标准品的浓度为 0.01, 0.1, 2, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$;

C、将工作浓度的伊维菌素包被抗原加入酶标板, 洗去未吸附抗原, 再加入封闭液封闭酶标板剩余的蛋白结合位点, 洗去多余的封闭物; 将所述的伊维菌素标准品与单链抗体 hsIVM8 的混合液和所述的待测样品与单链抗体 hsIVM8 的混合液分别加入酶标板, 使伊维菌素包被抗原与混合液中的标准品或待测样品对单链抗体 hsIVM8 进行竞争免疫结合反应, 在酶标板的微孔底部形成伊维菌素包被抗原-抗体复合物, 洗去游离的抗原和抗体; 然后加入辣根过氧化物酶 HRP 标记的 anti-His 抗体, 使在酶标板上形成包被抗原-抗体-二抗-HRP 复合物, 洗去未结合的酶标二抗; 再加入酶的底物, 在酶的催化作用下, 底物发生降解反应, 产生有色产物; 最后加入 50 μL /孔的 2M H_2SO_4 , 终止反应;

D、用酶标仪测定不同浓度标准品孔及待测样品孔的吸光值, 计算抑制率, 绘制伊维菌素标准品浓度对抑制率的标准曲线, 对线性范围进行回归分析, 建立伊维菌素标准抑制曲线的回归方程 $I = 23.986\text{Log}C + 35.267$, $R^2 = 0.9294$, 伊维菌素对单链抗体 hsIVM8 的抑制中浓度 IC_{50} 为 4.11 $\mu\text{g/mL}$, 伊维菌素最低检测限 IC_{10} 为 0.088 $\mu\text{g/mL}$, 线性检测范围在 0.1-5.0 $\mu\text{g/mL}$, 根据待测样品的吸光度计算待测样品的浓度; 所述的 I 为伊维菌素对单链抗体 hsIVM8 的抑制率, C 为伊维菌素浓度。

伊维菌素的单链抗体 hsIVM8 及其制备方法、其在免疫学检测的应用

技术领域：

[0001] 本发明涉及抗体，具体涉及一种伊维菌素的单链抗体 hsIVM8 及其制备方法、在免疫学检测的应用。

背景技术：

[0002] 伊维菌素 (IVM) 是大环内酯类广谱抗寄生虫药物，它通过与无脊柱动物神经细胞与肌肉细胞中谷氨酸为阀门的氯离子通道的高亲和力结合，从而导致细胞膜对氯离子通透性的增加，引起神经细胞或肌肉细胞超极化，使寄生虫麻痹或死亡。因其对多数线虫和节肢动物杀灭作用较强 [1]，且不易使寄生虫产生耐药性，已被世界各国广泛用于水产业，农业，畜牧业及人类热带雨林病 [2] 等的治疗。然而不规范用药会引起伊维菌素在环境，食品和动物体内的高残留，作为高毒性化合物，对人和自然界产生了潜在危害 [3-5]，使人类更加关注对 IVM 的检测，其中伊维菌素抗体在样品免疫检测中是关键。

[0003] 目前对伊维菌素残留检测的研究有液质、质谱 [6,7] 及依赖于单抗或多抗的 ELISA 法 [8]。但是伊维菌素的单链抗体制备以及免疫分析法的建立，国内外均没有文献报道。

[0004] 参考文献：

[0005] [1]LY Wen, XL Yan, FH Sun, et al. A randomized, double-blind, multicenter clinical trial on the efficacy of ivermectin against intestinal nematode infections in China[J]. Acta Tropica. 2008, 106 :190-194.

[0006] [2]Z. Tadesse, A. Hailemariam, J. H. Kolaczinski. Potential for integrated control of neglected tropical diseases in Ethiopia[J]. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2008, 102 :213-214.

[0007] [3]B. A. Halley, T. A. Jacob, A. Y. H. Lu, The environmental impact of the use of ivermectin: environmental effects and fate, Chemosphere. 18(1989)1543-1563.

[0008] [4]D. R. Hennesy, M. R. Alvinerie, Pharmacokinetics of the macrocyclic lactones: Conventional wisdom and new paradigms, Macrocyclic lactones in antiparasite therapy. New York: CABI Publishing; 2002. 97-124.

[0009] [5]R. A. Wall, L. Strong, Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin, Nature. 327(1987)418-421.

[0010] [6]J. Raich-Montiu, K. A. Krogh, M. Granados, J. A. Jonsson, B. Halling-Sørensen, Determination of ivermectin and transformation products in environmental waters using hollow fibre-supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1187(2008)275-280.

[0011] [7]K. A. Krogh, E. Bjorklund, D. Loeffler, G. Fink, B. Halling-Sørensen,

T. A. Ternes, Development of an analytical method to determine avermectins in water, sediments and soils using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1211 (2008) 60-69.

[0012] [8] D. J. Schmidt, C. E. Clarkson, T. A. Swanson, M. L. Egger, R. E. Carlson, J. M. Van Emon, A. E. Karu, Monoclonal antibodies for immunoassay of avermectins, J. Agric. Food Chem. 38 (1990) 1763-1770.

发明内容：

[0013] 发明目的

[0014] 目前伊维菌素残留检测方法依赖于昂贵的仪器，或是获得过程费时的多克隆抗体及实验环境要求苛刻的单克隆抗体。而廉价、快速、易于大批量获得的伊维菌素的单链抗体尚未见报道。本发明提供了一种廉价、简便、快捷的制备伊维菌素单链抗体的方法，并建立了依赖于单链抗体的适合大量样品快速筛查的伊维菌素免疫学检测方法。

[0015] 技术方案

[0016] 本发明的目的是这样实现的：

[0017] 一种伊维菌素的单链抗体 hsIVM8 核酸序列为 Seq NO. 1。

[0018] 一种伊维菌素的单链抗体 hsIVM8，其氨基酸序列为 Seq NO. 2。

[0019] 一种伊维菌素的单链抗体 hsIVM8 的制备，其特征在于：以伊维菌素-牛血清白蛋白结合物为包被抗原包被免疫管，通过固相抗原筛选法从人源噬菌体抗体库 Tomlinson J 中筛选展示伊维菌素单链抗体的噬菌体，用单克隆 ELISA 法筛选阳性噬菌体，将阳性噬菌体感染大肠杆菌 HB2151 进行可溶性抗体的表达，对单链抗体进行纯化，获得伊维菌素的单链抗体 hsIVM8。

[0020] 一种单链抗体 hsIVM8 在伊维菌素间接竞争 ELISA 检测方法的应用，其特征在于如下步骤：

[0021] A、间接非竞争 ELISA 法测定单链抗体 hsIVM8 的工作浓度及效价：选择 OD 值为 1.0 时的抗原抗体稀释浓度作为包被抗原、抗体工作浓度，以 $A_{\text{阳}450}/A_{\text{阴}450} > 2.1$ 的最大稀释倍数作为抗体的最终效价；

[0022] B、将伊维菌素标准品和待测样品与两倍工作浓度的单链抗体 hsIVM8 等体积混合过夜，所述的伊维菌素标准品的浓度为 0.01, 0.1, 2, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ ；

[0023] C、将工作浓度的伊维菌素包被抗原加入酶标板，洗去未吸附抗原，再加入封闭液封闭酶标板剩余的蛋白结合位点，洗去多余的封闭物；将所述的伊维菌素标准品与单链抗体 hsIVM8 的混合液和所述的待测样品与单链抗体 hsIVM8 的混合液分别加入酶标板，使伊维菌素包被抗原与混合液中的标准品或待测样品对单链抗体 hsIVM8 进行竞争免疫结合反应，在酶标板的微孔底部形成伊维菌素包被抗原-抗体复合物，洗去游离的抗原和抗体；然后加入辣根过氧化物酶 HRP 标记的 anti-His 抗体，使在酶标板上形成包被抗原-抗体-二抗-HRP 复合物，洗去未结合的酶标二抗；再加入酶的底物，在酶的催化作用下，底物发生降解反应，产生有色产物；最后加入 50 μL /孔的 2M H_2SO_4 ，终止反应；

[0024] D、用酶标仪测定不同浓度标准品孔及待测样品孔的吸光值，计算抑制率，绘制伊维菌素标准品浓度对抑制率的标准曲线，对线性范围进行回归分析，建立伊维菌素标准抑

制曲线的回归方程 $I = 23.986\text{Log}C + 35.267$, $R^2 = 0.9294$, 伊维菌素对单链抗体 hsIVM8 的抑制中浓度 IC_{50} 为 $4.11 \mu\text{g/mL}$, 伊维菌素最低检测限 IC_{10} 为 $0.088 \mu\text{g/mL}$, 线性检测范围在 $0.1-5.0 \mu\text{g/mL}$, 根据待测样品的吸光度计算待测样品的浓度; 所述的 I 为伊维菌素对单链抗体 hsIVM8 的抑制率, C 为伊维菌素浓度。

[0025] 所述的伊维菌素-牛血清白蛋白 (IVM-BSA) 的制备方法参照文献 D. J. Schmidt, C. E. Clarkson, T. A. Swanson, M. L. Egger, R. E. Carlson, J. M. Van Emon, A. E. Karu, Monoclonal antibodies for immunoassay of avermectins, J. Agric. Food Chem. 38(1990)1763-1770。

[0026] 所述的伊维菌素的单链抗体命名为 hsIVM8。

[0027] 所述的 HRP 标记的 anti-His 抗体及大肠杆菌 HB2151 均购自北京 GE 公司, Pharmacia 生产。

[0028] 本发明中所述的固相抗原筛选法具体为: 将 4mL , $100\mu\text{g/mL}$ 牛血清白蛋白 (BSA) 和伊维菌素-牛血清白蛋白 (IVM-BSA) 分别包被免疫管, 4°C 过夜, 次日用 8mL 含 2% 脱脂牛奶的 PBS (PBSM) 室温封闭 2h , 用含 0.5% Tween-20 的 PBS (PBST) 洗涤 3 次。加入 10^{12}pfu/mL 的人源噬菌体抗体库 Tomlinson J 于 4mL PBSM 中, 与固相化抗原 BSA 室温反应 1h 后置于摇床中缓慢振荡 1h 。取出上清加入包被有 IVM-BSA 的免疫管中, 室温反应 1h 后置于摇床中缓慢震荡 1h 。用 $500 \mu\text{L}$ Trypsin-PBS ($50 \mu\text{L}$ 的 10mg/mL trypsin 溶液加入 $450 \mu\text{L}$ PBS) 室温震荡洗脱 10min 。取 $250 \mu\text{L}$ 洗脱的噬菌体感染 1.75mL 处于对数生长期的大肠杆菌 TG1, 37°C 静置 30min , 取 $10 \mu\text{L}$ 铺板计算噬菌体滴度。按上述方法继续进行 3 次筛选, 并计算每轮筛选的产出率 (产出滴度 / 投入滴度)。1-4 轮筛选包被的 IVM-BSA 浓度依次为: $100, 75, 50, 20\mu\text{g/mL}$ 。

[0029] 所述的大肠杆菌 TG1 购自北京 GE 公司, Pharmacia 生产。

[0030] 所述的单克隆 ELISA 法筛选阳性噬菌体: 富集的重组噬菌体感染处于对数期的 TG1, 37°C 静置 30min , 37°C 摇床培养 1h 后涂布在含 $100 \mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素和 1% 葡萄糖的 TYE (TYE-AG) 固体培养基上, 37°C 培养过夜。随机挑选 96 个单菌落, 分别接种于 $200\mu\text{L}$ $2\times\text{TY-AG}$ 培养基中, 37°C 培养 2h , 加入 $25\mu\text{L}$ $2\times\text{YT-AG}$ M13K07 (10^9pfu/mL) 后继续培养 1h , 再 1800g 离心 10min , 倒掉上清, 菌体沉淀用含 $100 \mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素和 $50 \mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 $2\times\text{TY}$ ($2\times\text{TY-AK}$) 悬浮, 30°C 培养过夜。次日, 离心取上清单克隆 ELISA 鉴定: 每孔各取 $100\mu\text{L}$ 加入到包被有 IVM-BSA 并已经用 PBSM 封闭 2h 的 96 孔板中室温反应 1h , 以包被载体蛋白 BSA 的孔作为阴性对照。PBST 洗涤 6 次, 加入 $1:5000$ HRP-羊抗 M13 抗体, 37°C 孵育 1h , 同上洗涤后, 加 HRP 底物显色液显色 15min , 以 2M H_2SO_4 终止反应, 于波长 450nm 测定 OD 值, 高于阴性值 2.1 倍的视为阳性。经 ELISA 鉴定的阳性值最高的克隆菌株表达的单链抗体为 hsIVM8 (图 1)。

[0031] 所述的 HRP 标记的羊抗 M13 抗体购自北京 GE 公司, Pharmacia 生产。

[0032] 所述的阳性噬菌体感染大肠杆菌 HB2151 进行可溶性抗体的表达: 取出 $20\mu\text{L}$ 表达 hsIVM8 的过夜培养菌液加入到 2mL $2\times\text{TY-AG}$ 中, 37°C 摇床 1.5h , $3,300\text{g}$ 离心 10min , 去上清后沉淀以 2mL $2\times\text{TY-AK}$ 重悬, 37°C 摇床培养过夜。 $3,300\text{g}$ 离心 10min 后将上清加入含 20% 聚乙二醇 6000 和 2.5M NaCl (PEG/NaCl) 的溶液中, 混匀后置冰上 1h , $3,300\text{g}$ 离心 30min 尽可能的吸除管内的液体。以 $2\times\text{TY}$ 重悬重组噬菌体, 加入 1mL 处于对数期的大肠

杆菌 HB2151, 37°C 水浴 30min, 铺 TYE-AG 平板, 37°C 过夜培养。挑过夜培养 hsIVM8 的单克隆菌落于 3mL 2×TY-AG 中, 37°C 过夜培养。次日, 取 2mL 到 200mL 含 100ug/mL 氨苄青霉素和 0.1% 葡萄糖的 2×TY 中, 37°C 摇床培养 3h, 加 25mL 含 100ug/mL 氨苄青霉素和 9mM 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 25°C 培养 18h。

[0033] 单链抗体纯化: 经 IPTG 诱导表达的菌液于 3, 300g, 4°C 离心 15min, 弃上清, 菌体沉淀加入 10mL 上样缓冲液 (20mM Tris-Cl; 500mM NaCl; 10mM 咪唑; pH7.4) 重悬后置于冰上用超声波细胞破碎仪破碎细胞, 条件设为 400W, 工作 5s, 间隔 8s, 50 次循环。12, 000g, 4°C 离心 10min 取上清, 过 0.22 μm 膜过滤。镍亲和柱依次用双蒸水, 上样缓冲液冲洗至平衡, 过滤溶液上样, 再分别用上样和洗涤缓冲液 (20mM Tris-Cl; 500mM NaCl; 20-60mM 咪唑; pH7.4) 洗涤至平衡。最后用洗脱缓冲液 (20mM Tris-Cl; 500mM NaCl; 500mM 咪唑; pH7.4) 洗脱目的蛋白。流速均控制在 1mL/min。洗脱液立即用 PBS 透析过夜, 换液 3-4 次。用 12% SDS-PAGE 胶检测其纯度 (图 2)。

[0034] 获得伊维菌素的单链抗体 hsIVM8: ELISA 鉴定的阳性值最高的克隆菌株表达的 hsIVM8 核酸序列送上海英俊公司测序, 以确定其含有全长序列, hsIVM8 的核酸序列为 Seq No. 1; 并利用 Primer Premier 5.0 推导氨基酸序列, 以确定其能正确翻译成氨基酸, hsIVM8 的氨基酸序列为 Seq No. 2。

[0035] 本发明中所述的间接非竞争 ELISA 法测定抗体的工作浓度及效价, 具体方法为: 用方阵滴定法确定抗体及包被抗原的工作浓度。选择 OD 值为 1.0 时的抗原、抗体稀释浓度作为抗原、抗体工作浓度。并用工作浓度的包被抗原包被 96 孔微孔板, 将单链抗体 hsIVM8 进行倍比稀释, 以 PBS 溶液作为空白对照, 用间接非竞争 ELISA 法测定抗体效价, 以 $A_{\text{阳}450}/A_{\text{阴}450} > 2.1$ 的最大稀释倍数作为单链抗体 hsIVM8 的最终效价。

[0036] 建立单链抗体 hsIVM8 在伊维菌素间接竞争 ELISA 检测方法中的应用: 将 0.01, 0.1, 2, 5, 10 μg/mL 伊维菌素标准品和待测样品分别与两倍工作浓度的单链抗体 hsIVM8 等体积混合过夜; 工作浓度的伊维菌素包被抗原加入酶标板, 洗去未吸附抗原, 再加入封闭液封闭酶标板剩余的蛋白结合位点, 洗去多余的封闭物; 将所述的 0.01, 0.1, 2, 5, 10 μg/mL 伊维菌素标准品和待测样品与单链抗体 hsIVM8 的混合液加入酶标板, 使包被抗原与混合液中的标准品或待测样品对单链抗体 hsIVM8 进行竞争免疫结合反应, 在酶标板的微孔底部形成包被抗原-抗体复合物, 洗去游离的抗原和抗体; 然后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 anti-His 抗体, 使在酶标板上形成包被抗原-抗体-二抗-HRP 复合物, 洗去未结合的酶标二抗; 再加入酶的底物, 在酶的催化作用下, 底物发生降解反应, 产生有色产物; 最后加入 50 μL/孔的 2M H₂SO₄, 终止反应; 用酶标仪测定不同浓度标准品孔及待测样品孔的吸光值, 计算抑制率, 绘制伊维菌素标准品浓度对抑制率的标准曲线, 对线性范围进行回归分析, 建立伊维菌素标准抑制曲线的回归方程 $I = 23.986\text{Log}C + 35.267$ ($R^2 = 0.9294$), 伊维菌素对单链抗体 hsIVM 的抑制中浓度 (I_{50}) 为 4.11 μg/mL, 伊维菌素最低检测限 I_{10} 为 0.088 μg/mL, 线性检测范围在 0.1-5.0 μg/mL, 根据待测样品的吸光度计算待测样品的浓度 (图 4)。

[0037] 有益效果:

[0038] 1、本发明的优点在于: 国内外首次报道了伊维菌素的单链抗体 hsIVM8 制备与免疫学检测方法, 与现有的抗体获得途径相比, 该制备方法具有简单、快速、检测成本低等优

点。

[0039] 2、本发明的抗体易于基因操作和基因工程大量生产,可用于构建多种双功能抗体分子,有助于标记和偶联其他分子。

[0040] 3、本发明的抗体含有 (His)₆ 标签蛋白,易于检测和纯化。

[0041] 4、本发明中伊维菌素对抗体的抑制中浓度 (IC₅₀) 为 4.11 μg/mL,伊维菌素最低检测限 IC₁₀ 为 0.088 μg/mL,抗体对伊维菌素的线性检测范围为 0.1-5.0 μg/mL,适用于环境及农产品中伊维菌素残留检测。

附图说明

[0042] 图 1 筛选的 11 株阳性克隆的单克隆 ELISA

[0043] 图 2 过镍亲和柱纯化后的 SDS-PAGE 电泳图

[0044] 图 3 间接竞争 ELISA 法建立的伊维菌素检测标准抑制曲线

具体实施方式

[0045] 下面结合附图对本发明作进一步的描述。

[0046] 固相筛选法对噬菌体的富集

[0047] 用固相抗原筛选法从人源抗体库中筛选伊维菌素的单链抗体 hsIVM8:将 4mL, 100ug/mL 牛血清白蛋白 (BSA) 和伊维菌素-牛血清白蛋白 (IVM-BSA) 分别包被免疫管, 4℃ 过夜,次日用 8mL 含 2% 脱脂牛奶的 PBS (PBSM) 室温封闭 2h,用含 0.5% Tween-20 的 PBS (PBST) 洗涤 3 次。加入 10¹²pfu/mL 的噬菌体抗体库于 4mL PBSM 中,与固相化抗原 BSA 室温反应 1h 后置于摇床中缓慢振荡 1h。取出上清加入包被有 IVM-BSA 的免疫管中,室温反应 1h 后置于摇床中缓慢震荡 1h。用 500 μL Trypsin-PBS (50 μL 的 10mg/mL trypsin 溶液加入 450 μL PBS) 室温震荡洗脱 10min。取 250 μL 洗脱的噬菌体感染 1.75mL 处于对数生长期的大肠杆菌 TG1,37℃ 静置 30min,取 10 μL 铺板计算噬菌体滴度。按上述方法继续进行 3 次筛选,并计算每轮筛选的产出率。1-4 轮筛选包被的 IVM-BSA 依次为:100,75,50,20ug/mL。

[0048] 如表 1 所示,显示的是每轮富集后,特异性噬菌体在逐轮增加。为提高多样性,在首轮筛选是采用高浓度的包被原包被免疫管;为提高特异性,每轮包被原的量逐渐减少并增加洗涤强度。经过 4 轮筛选,产出/投入比趋于稳定。

[0049] 表 1 是固相筛选法对噬菌体的富集

[0050]

| 筛选轮数 | 包被原量 (ug/mL) | 投入滴度 (pfu) | 产出滴度 (cfu) | 产出/投入 |
|------|-----------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 1 | 100 | 7.1×10 ¹² | 9.6×10 ⁶ | 1.4×10 ⁻⁶ |
| 2 | 75 | 3.2×10 ¹² | 5.1×10 ⁷ | 1.6×10 ⁻⁵ |
| 3 | 50 | 4.5×10 ¹¹ | 5.2×10 ⁷ | 1.2×10 ⁻⁴ |
| 4 | 20 | 3.6×10 ¹¹ | 8.3×10 ⁷ | 2.3×10 ⁻⁴ |

[0051] 阳性克隆的单克隆 ELISA

[0052] 将富集的重组噬菌体感染处于对数期的 TG1, 37°C 静置 30min, 37°C 摇床培养 1h 后涂在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 1% 葡萄糖的 TYE (TYE-AG) 固体培养基上 37°C 培养过夜, 随机挑选 96 个单菌落, 分别接种于 200 μ L 2 \times TY-AG 培养基中, 37°C 培养 2h 后, 加入 25 μ L 2 \times YT-AG-M13K07 (10^9 pfu/mL), 37°C 摇床 250rpm 培养 1h, 再 1800g 离心 10min, 倒掉上清, 菌体沉淀用含 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 50 μ g/mL 卡那霉素的 2 \times TY (2 \times TY-AK) 悬浮, 30°C 培养过夜。次日, 离心取上清单克隆 ELISA 鉴定: 每孔各取 100 μ L 加入到包被有 IVM-BSA 并已经用 PBSM 封闭 2h 的 96 孔板中室温反应 1h, 以包被载体蛋白 BSA 的孔作为阴性对照。PBST 洗涤 6 次, 加入 1 : 5000HRP- 羊抗 M13 抗体, 37°C 孵育 1h, 同上洗涤后, 加 HRP 底物显色液显色 15min, 以 2M H₂SO₄ 终止反应, 于波长 450nm 测定 OD 值。

[0053] 如图 1 所示, 显示的是 11 个阳性克隆的单克隆 ELISA 值, 将其中 OD 值最高的克隆展示的抗体命名为 hsIVM8。

[0054] hsIVM8 的核酸序列测定

[0055] 将表达 hsIVM8 的单克隆菌液送上海英俊测序。序列显示, hsIVM8 的核酸含有完整的重轻链可变区, 序列完整, 具体见 Seq NO. 1。

[0056] hsIVM8 的氨基酸序列推导

[0057] 利用 Primer Premier 5.0 推导 hsIVM8 氨基酸序列, 序列显示, 氨基酸序列含有特征性的 (His)₆ 标签及 15 个弹性短肽, 具体见 Seq NO. 2。

[0058] 镍亲和柱纯化 hsIVM8 的 SDS-PAGE 电泳图

[0059] 挑过夜培养的表达式 hsIVM8 的单克隆菌落于 3mL 2 \times TY-AG 中, 37°C 过夜培养。次日, 取 2mL 到 200mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 0.1% 葡萄糖的 2 \times TY 中, 37°C 摇床培养 3h, 加 25mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 9mM 异丙基- β -D- 硫代半乳糖苷 (IPTG), 25°C 培养 18h。菌液于 3, 300g, 4°C 离心 15min, 弃上清, 菌体沉淀加入 10mL 上样缓冲液 (20mM Tris-Cl; 500mM NaCl; 10mM 咪唑; pH7.4) 重悬后置于冰上用超声波细胞破碎仪破碎细胞, 条件设为 400W, 工作 5s, 间隔 8s, 50 次循环。12, 000g, 4°C 离心 10min 取上清, 过 0.22 μ m 膜过滤。镍亲和柱依次用双蒸水, 上样缓冲液冲洗至平衡, 过滤溶液上样, 再分别用上样和洗涤缓冲液 (20mM Tris-Cl; 500mM NaCl; 20-60mM 咪唑; pH7.4) 洗涤至平衡。最后用洗脱缓冲液 (20mM Tris-Cl; 500mM NaCl; 500mM 咪唑; pH7.4) 洗脱目的蛋白。流速均控制在 1mL/min。洗脱液立即用 PBS 透析过夜, 换液 3-4 次。用 12% SDS-PAGE 胶检测其纯度。

[0060] 如图 2 所示, 泳道 1 是蛋白 Marker, 2 是纯化前菌液上清, 3 是经过镍亲和柱纯化, 500mM 咪唑洗脱下来的目标蛋白, 纯度较高达 95% 以上。说明重组单链抗体 hsIVM8 已成功纯化。

[0061] 间接非竞争 ELISA 法测定抗体的工作浓度及效价

[0062] (1) 工作浓度的确定

[0063] 用方阵滴定法确定抗体及包被抗原的工作浓度。选择 OD 值为 1.0 时的抗原抗体稀释浓度作为包被抗原、抗体工作浓度, 最终选择的包被抗原稀释倍数为 1/1000 (以蛋白计, 包被抗原实际浓度为 2 μ g/mL), 抗体的工作浓度为 1/32。具体操作步骤如下:

[0064] ①包被: CBS 包被缓冲液将包被原倍比稀释 100 \times 5ⁿ (n = 0.5, 1, 2, 4), 分别加于 96 孔酶标微孔板的 AB、CD、EF、GH 八行中, 100 μ L/孔, 4°C 过夜。

- [0065] ②封闭:每孔加 3% BSA 封闭液 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。
- [0066] ③加样:将倍比稀释 2n (n = 8, 16, 32, 64, 128, 256) 的抗体分别加于酶标板的 1 2、3 4、5 6、7 8、9 10、11 12 十二列孔中, 100 μ L/ 孔, 以 PBS 溶液为空白, 25 $^{\circ}$ C 孵育 2.5h。
- [0067] ④加酶标二抗:用含 3% BSA 的 PBS 溶液稀释酶标二抗到工作浓度, 100 μ L/ 孔加入酶标板, 25 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h。
- [0068] (以上每一步结束都用 PBST 洗涤液洗 3 次)
- [0069] ⑤显色:将底物溶液加到酶标板上, 100 μ L/ 孔, 25 $^{\circ}$ C 显色 15min。
- [0070] ⑥终止反应:将 2M H₂SO₄ 快速加到 96 孔中, 50 μ L/ 孔, 450nm 读取光吸收值。
- [0071] (2) 效价的测定
- [0072] 用方阵滴定法确定的包被原工作浓度包被 96 孔酶标微孔板, 将单链抗体 hsIVM8 进行倍比稀释, 以 PBS 溶液作为空白对照, 用间接非竞争 ELISA 法测定抗体效价, 具体步骤按照以下步骤进行。以 $A_{\text{阳}450}/A_{\text{阴}450} > 2.1$ 的最大稀释倍数作为抗体的最终效价。计算获得的抗体最终效价为 1/256。具体操作步骤如下:
- [0073] ①包被:将 2 μ g/mL 包被原加入 96 孔酶标微孔板中, 100 μ L/ 孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜。
- [0074] ②封闭:每孔加 3% BSA 封闭液 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。
- [0075] ③加样:将倍比稀释 2n (n = 4, 8, 16, 32, 64, 128) 的抗体分别加于酶标板的 12、34、56、78、910、1112 十二列孔中, 100 μ L/ 孔, 以 PBS 溶液为空白, 25 $^{\circ}$ C 孵育 2.5h。
- [0076] ④加酶标二抗:用含 3% BSA 的 PBS 溶液稀释酶标二抗到工作浓度, 100 μ L/ 孔加入酶标板, 25 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h。
- [0077] (以上每一步结束都用 PBST 洗涤液洗 3 次)
- [0078] ⑤显色:将底物溶液加到酶标板上, 100 μ L/ 孔, 25 $^{\circ}$ C 显色 15min。
- [0079] ⑥终止反应:将 2M H₂SO₄ 快速加到 96 孔中, 50 μ L/ 孔, 450nm 读取光吸收值。
- [0080] 间接竞争 ELISA 法建立伊维菌素的单链抗体免疫检测方法
- [0081] 间接竞争 ELISA (IC-ELISA) 的建立, 具体步骤如下:
- [0082] (1) 单链抗体 hsIVM8 与 0.01, 0.1, 2, 5, 10 μ g/mL 伊维菌素标准品和待测样品预混:用 PBS 将抗体稀释 16 倍 (两倍工作浓度), 再与等体积的伊维菌素标准品和待测样品室温预混进行前抑制, 对照用 PBS 与抗体等体积预混, 过夜。
- [0083] (2) 包被:将 2 μ g/mL 包被抗原加入酶标板, 100 μ L/ 孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜。
- [0084] (3) 封闭:每孔加 3% BSA 封闭液 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温浴 1h。
- [0085] (4) 加样品:将预混液加入酶标板, 100 μ L/ 孔, 以 PBS 为空白对照, 25 $^{\circ}$ C 温浴 2.5h。
- [0086] (5) 加酶标二抗:用含 3% BSA 的 PBS 将酶标二抗稀释到工作浓度加入酶标板, 100 μ L/ 孔, 25 $^{\circ}$ C 温浴 1.5h。
- [0087] (以上每一步结束都用洗涤液 PBST 洗 3 次)
- [0088] (6) 显色:将底物溶液加到酶标板上, 100 μ L/ 孔, 25 $^{\circ}$ C 显色 15min。
- [0089] (7) 终止反应:50 μ L/ 孔 2M H₂SO₄ 快速加到 96 孔酶标板中, 于 450nm 读取光吸收值。
- [0090] 将 0.01, 0.1, 2, 5, 10 μ g/mL 伊维菌素标准品对应的吸光值 (OD), 按照公式抑制率 (I) = 100[(OD 对照 - OD 标样)/OD 对照], 计算抑制率 (I)。以抑制率为纵坐标, 标样浓度 (C) 为横坐标绘制标准抑制曲线。建立伊维菌素的标准抑制曲线, 并对线性范围进行回归

分析。最后计算得到,伊维菌素线性回归方程为 $I = 23.986\text{Log}C + 35.267$ ($R^2 = 0.9294$),伊维菌素对抗体的抑制中浓度 (IC_{50}) 为 $4.11 \mu\text{g/mL}$,伊维菌素最低检测限 IC_{10} 为 $0.088 \mu\text{g/mL}$,线性检测范围在 $0.1-5.0 \mu\text{g/mL}$,如图 3 所示。

| | | |
|--------|--|-----|
| [0091] | 序列表 | |
| [0092] | SEQUENCE LISTING | |
| [0093] | <110> 江苏省农业科学院 | |
| [0094] | <120> 伊维菌素的单链抗体 hsIVM8 及其制备方法、其在免疫学检测的应用 | |
| [0095] | <130> [1] LY Wen, XL Yan, FH Sun, et al. A randomized, double-blind, | |
| [0096] | multicenter clinical trial on the efficacy of ivermectin against | |
| [0097] | intestinal nematode infections in China[J]. Acta Tropica. | |
| [0098] | 2008, 106 : 190-194. | |
| [0099] | <160> 2 | |
| [0100] | <170> Patent In version 3.3 | |
| [0101] | <210> 1 | |
| [0102] | <211> 798 | |
| [0103] | <212> DNA | |
| [0104] | <213> 人工序列 | |
| [0105] | <400> 1 | |
| [0106] | gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc | 60 |
| [0107] | tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcc ttagctgggt cegccaggct | 120 |
| [0108] | ccaggaagg ggctggagt ggtctcatcg atttgtcatg agggtaagcc gacatattac | 180 |
| [0109] | gcagactccg tgaagggcag gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat | 240 |
| [0110] | ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagtgat | 300 |
| [0111] | catacgtttg actactgggg ccaggaacc ctggtcaccg tctcgagcgg tggaggcgggt | 360 |
| [0112] | tcaggcggag gtggcagcgg cgggtggcggg tcgacggaca tccagatgac ccagtctcca | 420 |
| [0113] | tcctccctgt ctgcactgt aggagacaga gtcaccatca cttgccgggc aagtcagagc | 480 |
| [0114] | attagcagct atttaaattg gtatcagcag aaaccagga aagcccctaa gctcctgatc | 540 |
| [0115] | tatccggcat cccctttgca aagtggggtc ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg | 600 |
| [0116] | acagatttea ctctcaccat cagcagtctg caacctgaag attttgcaac ttactactgt | 660 |
| [0117] | caacagcggg cgagggcgcc tacgacgttc ggccaagga ccaaggtgga aatcaaacgg | 720 |
| [0118] | gcggccgcac atcatcatca ccatcacggg gccgcagaac aaaaactcat ctccagaagag | 780 |
| [0119] | gatctgaatg gggccgca | 798 |
| [0120] | <210> 2 | |
| [0121] | <211> 266 | |
| [0122] | <212> PRT | |
| [0123] | <213> 人工序列 | |
| [0124] | <400> 2 | |
| [0125] | Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly | |
| [0126] | 1 5 10 15 | |

| | |
|--------|---|
| [0127] | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr |
| [0128] | 20 25 30 |
| [0129] | Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |
| [0130] | 35 40 45 |
| [0131] | Ser Ser Ile Cys His Glu Gly Lys Pro Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val |
| [0132] | 50 55 60 |
| [0133] | Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr |
| [0134] | 65 70 75 80 |
| [0135] | Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |
| [0136] | 85 90 95 |
| [0137] | Ala Lys Ser Asp His Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |
| [0138] | 100 105 110 |
| [0139] | Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |
| [0140] | 115 120 125 |
| [0141] | Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser |
| [0142] | 130 135 140 |
| [0143] | Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser |
| [0144] | 145 150 155 160 |
| [0145] | Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro |
| [0146] | 165 170 175 |
| [0147] | Lys Leu Leu Ile Tyr Pro Ala Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser |
| [0148] | 180 185 190 |
| [0149] | Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser |
| [0150] | 195 200 205 |
| [0151] | Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ala |
| [0152] | 210 215 220 |
| [0153] | Arg Ala Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg |
| [0154] | 225 230 235 240 |
| [0155] | Ala Ala Ala His His His His His His Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu |
| [0156] | 245 250 255 |
| [0157] | Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala |
| [0158] | 260 265 |

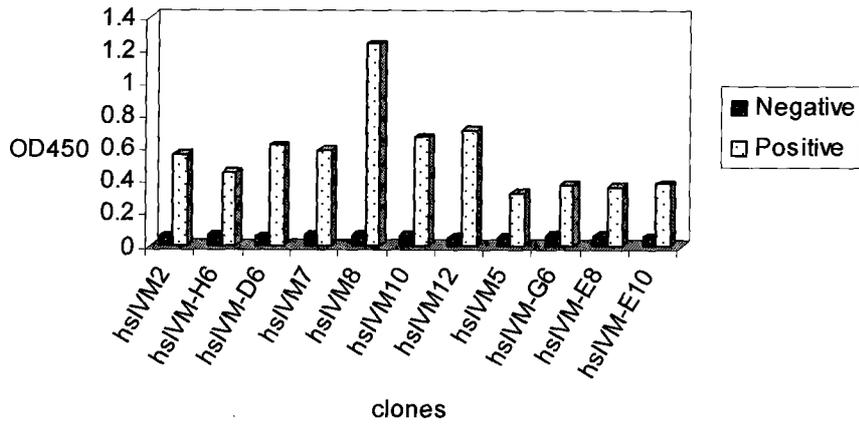


图 1

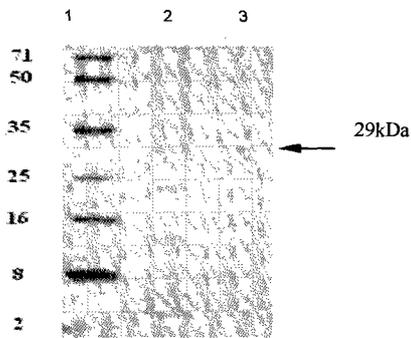


图 2

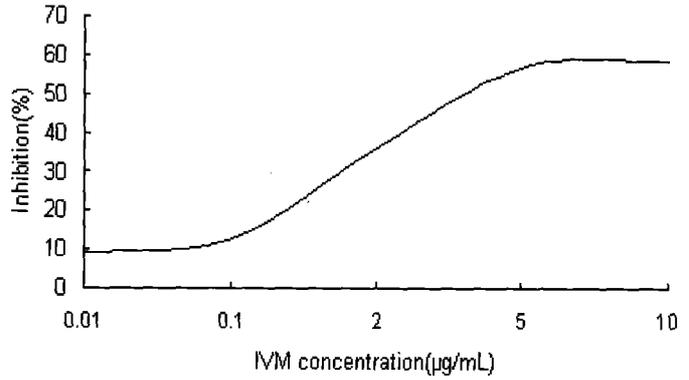


图 3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 伊维菌素的单链抗体hsIVM8及其制备方法、其在免疫学检测的应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN101717448A | 公开(公告)日 | 2010-06-02 |
| 申请号 | CN200910223819.3 | 申请日 | 2009-11-23 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 江苏省农业科学院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 江苏省农业科学院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 江苏省农业科学院 | | |
| [标]发明人 | 刘贤进 温爽 张晓 刘媛 | | |
| 发明人 | 刘贤进 温爽 张晓 刘媛 | | |
| IPC分类号 | C07K16/44 C12N15/13 G01N33/53 G01N21/31 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及抗体，具体涉及一种伊维菌素的单链抗体hsIVM8及其制备方法、在免疫学检测的应用；本发明为以伊维菌素-牛血清白蛋白结合物为包被抗原包被免疫管，通过固相抗原筛选法从人源噬菌体抗体库 Tomlinson J 中筛选展示伊维菌素单链抗体的噬菌体，用单克隆ELISA法筛选阳性噬菌体，将阳性噬菌体感染大肠杆菌HB2151进行可溶性抗体的表达，对单链抗体hsIVM8进行纯化，获得伊维菌素的单链抗体hsIVM8。本发明的优点在于：国内外首次报道了伊维菌素的单链抗体hsIVM8制备与免疫学检测方法，与现有的获得抗体的途径相比，该制备方法具有简单、快速、成本低等优点。

