



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110684080 A

(43)申请公布日 2020.01.14

(21)申请号 201910791323.X

C12N 15/11(2006.01)

(22)申请日 2019.08.26

C07D 417/06(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 许艇 何金鑫 徐波杰 王楷
李季

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 黄爽

(51)Int.Cl.

C07K 14/00(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页

序列表2页 附图1页

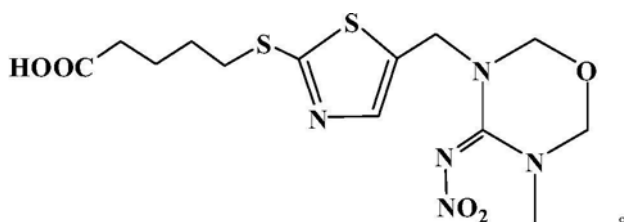
(54)发明名称

一种适用于噻虫嗪残留分析的scFv-ELISA试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种适用于噻虫嗪残留分析的scFv-ELISA试剂盒。所述试剂盒包括盒体、设在盒体内的酶标板以及试剂；其中，酶标板的每个孔包被有噻虫嗪包被抗原，所述试剂包括抗噻虫嗪单链抗体、噻虫嗪标准溶液、酶标记的二抗、缓冲液PBS、洗涤液PBST、底物液、显色液和反应终止液等。检测过程中，酶标板孔壁上吸附的包被抗原和待测噻虫嗪相互竞争与抗体反应，通过显色反应观察结果。检测已知浓度的噻虫嗪并绘制标准曲线，可以推算出待测噻虫嗪的浓度。本发明的优点在于能够准确灵敏地检测水体、蔬菜和水果中的噻虫嗪残留，克服了仪器检测中样品前处理过程繁琐、操作复杂耗时等缺点，同时大大节约了检测成本。

1. 一种分离的多肽,其特征在于,所述多肽包含如下的氨基酸序列或由其组成:
 - i) SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;或
 - ii) 在i)的N端和/或C端连接标签得到的氨基酸序列;或
 - iii) i)或ii)的氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸得到的具有相同功能的多肽。
2. 编码权利要求1所述多肽的核酸分子。
3. 含有权利要求2所述核酸分子的生物材料,所述生物材料为重组DNA、表达盒、转座子、质粒载体、噬菌体载体、病毒载体、工程菌或转基因细胞系。
4. 噻虫嗪检测试剂或试剂盒,其特征在于,有效成分为权利要求1所述多肽。
5. 噻虫嗪半抗原,其特征在于,其为3-[2-(2-羧乙硫基)-5-乙甲基]-5-甲基-4-亚硝胺基-1,3,5-噁二嗪烷,结构式如下:



6. 噻虫嗪人工抗原,其特征在于,由权利要求5所述噻虫嗪半抗原与载体蛋白偶联后得到;

其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白;优选牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白。

7. 一种适用于噻虫嗪残留分析的scFv-ELISA试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括盒体、设在盒体内可拆卸的酶标板以及设在盒体内的试剂;所述酶标板的每个孔包被有权利要求6所述噻虫嗪人工抗原,所述试剂包括抗噻虫嗪单链抗体,以及噻虫嗪标准溶液、酶标二抗、缓冲液PBS、洗涤液PBST、显色液和反应终止液中的至少一种;

其中,所述抗噻虫嗪单链抗体为权利要求1所述多肽。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,用于包被酶标板的抗原包被液的制备方法包括:

(1) 将7.788-15.76mg权利要求5所述噻虫嗪半抗原、2.76-5.52mg N-羟基丁二酰亚胺、4.738-9.476mg二环己基碳二亚胺溶于200-400μL无水二甲基甲酰胺中,然后将其放置于磁力搅拌器上,室温下搅拌反应过夜,次日将反应溶液在5000rpm条件下离心10-20min,上清液即为活性酯溶液;

(2) 将20-40mg牛血清白蛋白溶于2-4mL 0.05M, pH 9.6的碳酸盐缓冲液中,将其置于磁力搅拌器上搅拌,逐滴加入上述活性酯溶液,20-30min加完,然后室温下继续搅拌反应6h;

(3) 反应结束后,将反应液装入透析袋内用PBS液透析;每6h换液一次,共换液5-6次;透析后离心,弃沉淀,收集上清液,作为抗原包被液;

优选地,用于包被酶标板的抗原包被浓度为100ng/mL。

9. 根据权利要求7或8所述的试剂盒,其特征在于,所述酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的His标签抗体,浓度为0.1μg/mL;和/或

所述显色液包括A液和B液,A液由过氧化脲1g、柠檬酸10.3g、Na₂HPO₄·12H₂O 35.8g、吐

温-20 100 μ L和蒸馏水1000mL配制而成,pH值5;B液由四甲基联苯胺700mg、DMSO 40mL、柠檬酸10.3g和蒸馏水1000mL配制而成,pH值7.4;和/或

所述反应终止液为2M的硫酸。

10. 权利要求1所述多肽的以下任一应用:

- 1) 用于噻虫嗪检测;
- 2) 用于制备噻虫嗪检测试剂或试剂盒。

一种适用于噻虫嗪残留分析的scFv-ELISA试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程、噬菌体展示技术以及ELISA检测技术领域,具体地说,涉及一种适用于噻虫嗪残留分析的scFv-ELISA试剂盒。

背景技术

[0002] 噻虫嗪是一种新烟碱类杀虫剂,具有广谱杀虫活性,可用于多种咀嚼式口器害虫和刺吸式口器害虫的防治,在全球范围内得到了广泛的使用。这类农药残留的常规检测方法主要是仪器分析法,包括气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、气/液相色谱-质谱联用法(GC/LC-MS)等。这些分析方法虽然精确度高,但其所需的仪器价格昂贵,样品的分离、提取、净化、衍生化等前处理复杂,分析速度慢、检测灵敏度低,难以实现现场快速检测。随着待检样品、特别是要求现场快速检测样品量的迅速增加,传统的农药残留分析手段难以适应要求,因此,亟待开发一种高效便捷的噻虫嗪检测方法。

[0003] 免疫分析法是根据抗原抗体的特异性反应对微生物、蛋白质等物质进行检测的方法,与传统的仪器检测相比,具有操作简便、灵敏度高、特异性强和能够实现现场快速检测等优点,可以为噻虫嗪的残留检测提供一种高效便捷的检测方法。抗体的选择是免疫分析方法的核​​心,与常规抗体相比,单链抗体具有分子量小、易表达、生产成本低等特点,且禽源的单链抗体更具有制备过程相对简便、抗体交叉反应低等优势。本发明以抗噻虫嗪单链抗体为基础,结合酶联免疫吸附分析方法,从而为环境、食品中噻虫嗪的残留检测提供一种快速、简便的方法。

发明内容

[0004] 本发明针对目前农药残留仪器分析方法成本高、前处理复杂、特异性差、灵敏度低和难以实现现场检测等缺点,提供一种高特异性、高灵敏度、高准确度、高精确度、操作方法的简单,并能用于大批量样品快速检测、分析噻虫嗪残留的ELISA检测试剂盒。可用于水体、蔬菜、水果等样品中噻虫嗪残留的快速测定。

[0005] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供一种分离的多肽,所述多肽包含如下的氨基酸序列或由其组成:

[0006] i) SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;或

[0007] ii) 在i)的N端和/或C端连接标签得到的氨基酸序列;或

[0008] iii) i)或ii)的氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸得到的具有相同功能的多肽。

[0009] 所述多肽可作为抗噻虫嗪单链抗体。

[0010] 所述抗噻虫嗪单链抗体可按照如下方法进行制备:利用化学反应合成噻虫嗪的半抗原Thi-5C,将半抗原与钥孔血蓝蛋白偶联后作为免疫原,免疫实验动物SPF来航鸡,提取外周血淋巴细胞的总RNA,经反转录及重叠PCR,克隆出单链抗体scFv基因片段,通过酶切连接,将基因片段克隆至噬菌粒载体,高效电转化至大肠杆菌,经辅助噬菌体拯救,构建得到

噬菌体单链抗体库,筛选出特异的噻虫嗪噬菌体单链抗体,将其表达纯化,得到灵敏度高,特异性强的抗噻虫嗪单链抗体。该方法制备的单链抗体分子小,可剪性强,耐高温,易纯化,易表达。

[0011] 其中,所述噻虫嗪半抗原Thi-5C可按照如下方法制备得到:

[0012] 将3.0g 3-甲基-4-硝基亚胺四氢-1,3,5-噻二嗪,5.0g 2-氯-5-溴甲基噻唑和6.25g碳酸钾于20毫升二甲基甲酰胺(DMF)中30℃溶解过夜,50℃反应16h。反应混合物经硅藻土过滤后,真空减压去除DMF。采用闪蒸色谱法对产物进行纯化,得到噻虫嗪。

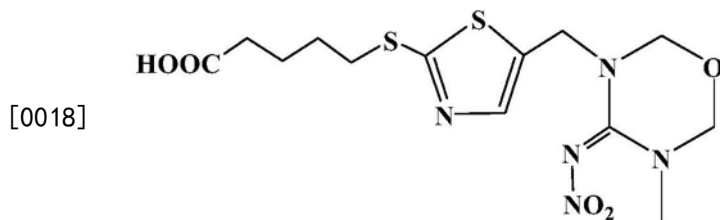
[0013] 在一个50毫升的圆底烧瓶中,将0.5g噻虫嗪、0.2g 3-巯基丙酸和0.2g 85%氢氧化钾(粉末)在15mL DMSO中加热至75℃,持续3天。将溶液倒入100mL水中,调节pH为3.0,再用乙酸乙酯萃取(3次,每次用量30mL)。有机相用1mol/L的盐酸洗涤,然后用无水Na₂SO₄干燥,真空减压除去有机溶剂。残渣用甲醇溶解,采用薄层色谱法对产物进行分离,最终得到3-[2-(2-羧乙巯基)-5-乙甲基]-5-甲基-4-亚硝胺基-1,3,5-噻二嗪烷。

[0014] 第二方面,本发明提供编码所述多肽的核酸分子。

[0015] 第三方面,本发明提供含有所述核酸分子的生物材料,所述生物材料包括但不限于重组DNA、表达盒、转座子、质粒载体、噬菌体载体、病毒载体、工程菌或转基因细胞系。

[0016] 第四方面,本发明提供一种噻虫嗪检测试剂或试剂盒,有效成分为所述多肽。

[0017] 第五方面,本发明提供一种噻虫嗪半抗原,其为3-[2-(2-羧乙巯基)-5-乙甲基]-5-甲基-4-亚硝胺基-1,3,5-噻二嗪烷。结构式如下:



[0019] 第六方面,本发明提供一种噻虫嗪人工抗原,由所述噻虫嗪半抗原与载体蛋白偶联后得到。

[0020] 其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白;优选牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白。

[0021] 优选地,采用活化酯法将载体蛋白偶联于所述噻虫嗪半抗原的羧基基团上。

[0022] 第七方面,本发明提供一种适用于噻虫嗪残留分析的scFv-ELISA试剂盒,所述试剂盒包括盒体、设在盒体内可拆卸的酶标板以及设在盒体内的试剂等;所述酶标板的每个孔包被有所述噻虫嗪人工抗原,所述试剂包括抗噻虫嗪单链抗体,以及噻虫嗪标准溶液、酶标二抗、缓冲液PBS、洗涤液PBST、显色液和反应终止液等中的至少一种。

[0023] 用于包被酶标板的抗原包被液的制备方法包括:

[0024] (1) 将7.788-15.76mg权利要求5所述噻虫嗪半抗原、2.76-5.52mg N-羟基丁二酰亚胺(NHS)、4.738-9.476mg二环己基碳二亚胺(DCC)溶于200-400μL无水二甲基甲酰胺(DMF)中,然后将其放置于磁力搅拌器上,室温下搅拌反应过夜,次日将反应溶液在5000rpm条件下离心10-20min,上清液即为活性酯溶液;

[0025] (2) 将20mg牛血清白蛋白溶于2mL 0.05M, pH 9.6的碳酸盐缓冲液中,将其置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,逐滴缓慢加入上述活性酯溶液,约20min加完,然后室温下继续搅拌

反应6h;

[0026] (3) 反应结束后,将反应液装入透析袋内用PBS液透析;每6h换液一次,共换液5-6次;透析后离心,弃沉淀,收集上清液,作为抗原包被液。

[0027] 优选地,用于包被酶标板的抗原包被浓度为100ng/mL。

[0028] 所述酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的His标签抗体,浓度为0.1μg/mL。

[0029] 所述显色液包括A液和B液,A液由过氧化脲1g、柠檬酸10.3g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.8g、吐温-20 100μL和蒸馏水1000mL配制而成,pH值5;B液由四甲基联苯胺700mg、DMSO 40mL、柠檬酸10.3g和蒸馏水1000mL配制而成,pH值7.4。

[0030] 所述反应终止液为2M的硫酸。

[0031] 第八方面,本发明提供所述多肽的以下任一应用:

[0032] 1) 用于噻虫嗪检测;

[0033] 2) 用于制备噻虫嗪检测试剂或试剂盒。

[0034] 第九方面,本发明提供一种噻虫嗪ELISA检测试剂,有效成分为所述抗体。

[0035] 第十方面,本发明提供所述试剂盒或所述试剂在ELISA法检测样品中噻虫嗪残留的应用。

[0036] 实际分析检测时,向包被有所述噻虫嗪包被抗原的酶标板各孔中依次加入待测噻虫嗪样品和所述抗噻虫嗪单链抗体,固相包被抗原和待测噻虫嗪相互竞争与单链抗体反应,由于每个孔中的固相抗原和加入的单链抗体含量均一致,因此当待测的噻虫嗪浓度高时,则被结合在固相抗原上的抗体少,加入的酶标二抗与被固定抗体结合量少,最后加入底物液和显色液,显色反应浅,用酶标仪检测的OD值低,表明抑制率高;反之,当待测噻虫嗪浓度低时,则所测的OD值高,抑制率低。根据用已知浓度的噻虫嗪标准溶液检测所绘制标准曲线,即可推算出待测噻虫嗪的浓度。

[0037] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0038] 利用本发明提供的试剂盒能够准确灵敏地检测水和蔬菜中噻虫嗪残留,样品的前处理过程简单,耗时少,特异性好,灵敏度高(最低检测限 IC_{10} 为4ng/mL),能同时检测大量的样品,样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。对解决大批量样品的噻虫嗪残留现场检测技术具有重要意义。

附图说明

[0039] 图1为本发明实施例6中基于单链抗体的噻虫嗪的标准抑制曲线。

具体实施方式

[0040] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例均按照常规实验条件,如Sambrook等分子克隆实验手册(Sambrook J&Russell DW, Molecular Cloning:a Laboratory Manual,2001),或按照制造厂商说明书建议的条件。

[0041] 实施例1半抗原3-[2-(2-羧乙硫基)-5-乙甲基]-5-甲基-4-亚硝胺基-1,3,5-噁二嗪烷的合成

[0042] 将3.0g 3-甲基-4-硝基亚胺四氢-1,3,5-噁二嗪,5.0g 2-氯-5-溴甲基噻唑和6.25g碳酸钾于20毫升二甲基甲酰胺(DMF)中30℃溶解过夜,50℃反应16h。反应混合物经硅

藻土过滤后,真空减压去除DMF。采用闪蒸色谱法对产物进行纯化,得到噻虫嗪。

[0043] 在一个50毫升的圆底烧瓶中,将0.5g噻虫嗪、0.2g 3-巯基丙酸和0.2g 85%氢氧化钾(粉末)在15mL DMSO中加热至75℃,持续3天。将溶液倒入100ml水中,调节pH为3.0,再用乙酸乙酯萃取(3次,每次用量30ml)。有机相用1mol/L的盐酸洗涤,然后用无水Na₂SO₄干燥,真空减压除去有机溶剂。残渣用甲醇溶解,采用薄层色谱法对产物进行分离,最终得到3-[2-(2-羧乙巯基)-5-乙甲基]-5-甲基-4-亚硝胺基-1,3,5-噁二嗪烷。

[0044] 实施例2噻虫嗪包被抗原的制备

[0045] 本发明中使用的噻虫嗪包被抗原为噻虫嗪半抗Thi-5C与牛血清白蛋白(BSA)偶联的复合物,所述包被抗原的制备方法如下:

[0046] (1) 分别称取7.788mg的噻虫嗪半抗原Thi-5C、2.76mg N-羟基丁二酰亚胺(NHS)、4.738mg二环己基碳二亚胺(DCC)溶于200μL无水二甲基甲酰胺(DMF)中,然后将其放置于磁力搅拌器上,室温下搅拌反应过夜,次日将反应溶液在5000rpm条件下离心15min,上清液即为活性酯溶液。

[0047] (2) 称取20mg牛血清蛋白溶于2mL 0.05 M, pH 9.6的碳酸盐缓冲液中,将其置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,逐滴缓慢滴加上述活性酯溶液,约20min加完,然后室温下继续搅拌反应6h。

[0048] (3) 反应结束后,将反应液装入透析袋内用PBS (0.01mol/L, pH 7.4) 透析;每6h换液一次,共换液5-6次。透析后离心,弃沉淀,收上清液,作为抗原包被液。

[0049] 实施例3噻虫嗪噬菌体展示单链抗体库的构建

[0050] 采用活性酯法将实施例1合成的半抗原与钥孔血蓝蛋白偶联,具体方法如下:

[0051] 将等摩尔量的噻虫嗪半抗原Thi-5C、NHS和DCC溶于DMF中,室温下搅拌过夜反应。将反应液离心弃沉淀,上清液为活性酯溶液。将上清液在搅拌状态下加入钥孔血蓝蛋白溶液中,室温下继续搅拌反应4h。反应液装入透析袋内用PBS透析。离心,收集上清,冷冻干燥后即得噻虫嗪半抗原Thi-5C与钥孔血蓝蛋白的偶联物(Thi-5C-KLH)。

[0052] 免疫取100μL免疫原(Thi-5C-KLH)溶于无菌生理盐水中,与等体积完全佐剂(初免)或弗氏不完全佐剂(二免及以后)混合,充分乳化后在SPF来航鸡的肌肉处进行多点注射,之后每隔14天免疫一次,共免疫5~6次。从第三次免疫开始,每次免疫后一周从静翅脉采血检测血清效价。

[0053] 第6次免疫后,取SPF来航鸡脾脏,提取总RNA,经反转录PCR及重叠PCR,克隆出scFv基因片段,用限制性内切酶Sfi I对pComb3X质粒载体和scFv基因片段进行酶切,通过T4连接酶将VHH基因片段连接至噬菌粒pComb3x,高效电转化至大肠杆菌ER2738中,构建噻虫嗪的噬菌体单链抗体库。经测定,初级库容量达10⁸cfu,加入辅助噬菌体(感染复数为20:1) M13K07进行拯救,得到噬菌体单链抗体库(噬菌体展示scFv文库),库容量为10¹³pfu/mL,库的多样性良好。

[0054] 反转录PCR:

[0055] 反转录试剂盒采用M-MLV第一链cDNA合成试剂盒,购自OMEGA公司。

[0056] 反转录体系如下:

	试剂	体积
	总 RNA	5 μ L
	gDNA 去除剂	1 μ L
[0057]	Oligo(dT) ₁₈ 引物	1 μ L
	无 RNA 酶水	2 μ L
	2 $\times$ TS 反应液	10 μ L
	反转录酶	1 μ L

[0058] 42 $^{\circ}$ C 反转录 30min

[0059] 重叠 PCR:

[0060] 第一轮 PCR:

[0061] 反应体系如下:

	试剂	体积	试剂	体积
	VH		VL	
	单链 DNA (cDNA)	5 μ L	cDNA	5 μ L
	重链上游引物 HF	1 μ L	轻链上游引物 LF	1 μ L
[0062]	重链下游引物 HR	1 μ L	轻链下游引物 LR	1 μ L
	10 $\times$ PCR Buffer	5 μ L	10 $\times$ PCR Buffer	5 μ L
	dNTP 混合物	2 μ L	dNTP 混合物	2 μ L
	EX-Taq-HS 酶	0.5 μ L	EX-Taq-HS 酶	0.5 μ L
	ddH ₂ O	35.5 μ L	ddH ₂ O	35.5 μ L

[0063] 反应程序如下:

95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;

[0064] $\left. \begin{array}{l} 94\text{ }^{\circ}\text{C } 30\text{ s} \\ 57\text{ }^{\circ}\text{C } 30\text{ s} \\ 72\text{ }^{\circ}\text{C } 45\text{ s} \end{array} \right\} 30\text{ 个循环}$

72 $^{\circ}$ C 10 min

4 $^{\circ}$ C ∞

[0065] 第二轮 PCR:

[0066] 反应体系如下:

	试剂	体积
[0067]	重链上游引物 HF	2 μ L
	轻链下游引物 LR	2 μ L
	重链 DNA (VH)	1 μ L
	轻链 DNA (VL)	1 μ L
	10 $\times$ PCR Buffer	5 μ L
	dNTP 混合物	2 μ L
	EX-Taq-HS 酶	0.2 μ L
	ddH ₂ O	36.8 μ L

[0068] 反应程序如下:

95 $^{\circ}$ C 预变性 3min;
 94 $^{\circ}$ C 30s
 57 $^{\circ}$ C 30s } 30 个循环
 72 $^{\circ}$ C 45s
 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min
 4 $^{\circ}$ C ∞

[0070] PCR引物序列如下:

[0071] 扩增重链VH基因片段的引物:

[0072] HF: 5'-GGCCCAGGCGGCCCCGTGACGTTGGACGAGTCCG-3'

[0073] HR: 5'-CAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCGGAGGAGACGATGACT-3'

[0074] 扩增轻链VL基因片段的引物:

[0075] LF: 5'-TTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGCGCGACTCAGC-3'

[0076] LR: 5'-GGCCGGCCTGGCCACTAGGACGGTCAGGGTTGTC-3'

[0077] 实施例4特异性噬虫噬菌体展示单链抗体的筛选

[0078] 在96孔酶标板的第1个孔包被实施例2制备的包被抗原,包被浓度为100ng/mL,4 $^{\circ}$ C过夜;次日,倒出包被液,用PBST洗涤3次,在前两个孔中加入150 μ L 1%的明胶,后四个孔中加入150 μ L的1%BSA溶液,室温孵育1h;取实施例3的噬菌体展示scFv文库110 μ L,加入110 μ L的3%BSA溶液,25 $^{\circ}$ C,220rpm,摇床震荡1h,使噬菌体能够充分与BSA结合,从而去除与BSA特异性结合的噬菌体抗体;弃液体,PBST洗涤三次,每次1min,在前两个孔中各加入100 μ L的预混好的文库,在室温条件下振荡反应2h,使噬菌体能够与包被原充分结合;弃液体,PBST洗涤三次,每次1min;在前两个孔中各加入稀释好的噬虫噬菌体标准品100 μ L,室温振荡反应1h,使噬虫噬菌体标准品与包被原竞争结合噬菌体抗体,从而使与噬虫噬菌体标准品结合能力强的噬菌体抗体洗脱下来;将前两个孔中的竞争洗脱液转入后四个孔中,每孔50 μ L,室温振荡反应1h,从而去除与BSA特异性结合的噬菌体抗体;收集孔中的噬菌体洗脱液,取其中的10 μ L梯度稀释后测其滴度,其余的用于扩增。

[0079] 将噬菌体洗脱液加入新鲜的大肠杆菌ER2738菌液,37 $^{\circ}$ C静置15min;加入羧苄青霉素和SB培养基,37 $^{\circ}$ C,220rpm,培养2h;加入辅助噬菌体M13K07(感染复数MOI=20:1)和卡那

霉素,培养过夜;次日,离心取上清,加入PEG-NaCl溶液沉淀纯化噬菌体。

[0080] 将扩增产物进行下一轮筛选,保证每轮筛选加入量相同,抗原包被浓度及噬虫毒素标准品竞争洗脱浓度按2倍递减,计算每轮的滴度,挑取单克隆进行扩增及ELISA鉴定。经4轮淘选得到阳性单克隆。

[0081] 实施例5特异性噬虫毒素单链抗体的表达

[0082] 提取阳性单克隆质粒,化转至大肠杆菌TOP10F'感受态细胞,复苏后涂布于固体培养基过夜培养。次日,挑取单个克隆于LB-羧苄培养基中培养,加入IPTG诱导过夜表达;次日,用超声破碎仪裂解细胞,滤膜过滤后用镍柱纯化,得到高纯度的抗噬虫毒素单链抗体。经氨基酸测序分析,所得单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0083] 实施例6分析噬虫毒素残留的ELISA检测试剂盒及其应用

[0084] 所述试剂盒包括盒体、设在盒体内可拆卸的96孔酶标板以及设在盒体内的试剂,其中,所述酶标板的每个孔包被有实施例2制备的噬虫毒素包被抗原,所述试剂包括实施例5的抗噬虫毒素单链抗体、噬虫毒素标准溶液、酶标记的二抗、缓冲液PBS、洗涤液PBST、底物液(A液)、显色液(B液)和反应终止液等。

[0085] 酶标记的二抗为辣根过氧化物酶标记的抗His标签抗体,浓度为0.1 μ g/mL。购自Abcam公司。

[0086] A液由过氧化脲1g、柠檬酸10.3g、Na₂HPO₄·12H₂O 35.8g、吐温-20 100 μ L和蒸馏水1000mL配制而成,pH值5。

[0087] B液由四甲基联苯胺700mg、DMSO 40mL、柠檬酸10.3g和蒸馏水1000mL配制而成,pH值2.4。

[0088] 反应终止液为2M的硫酸液。

[0089] 将包被抗原包被于96孔酶标板上,每个孔包被浓度为100ng/mL,4 $^{\circ}$ C过夜反应;次日,甩出孔中的液体,用含0.05%吐温的PBST洗3次,将酶标板倒置在吸水纸上拍干;加入封闭液,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟,甩出孔中的液体,用0.05%PBST洗3次,将酶标板倒置在吸水纸上拍干;配制0ng/mL,1ng/mL,4ng/mL,12ng/mL,37ng/mL,111ng/mL,333ng/mL,1000ng/mL的噬虫毒素标准液,加入50 μ L标样或处理好的样品到各孔中,标样和样品做2-4个重复,加入50 μ L稀释的抗体,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟;甩出孔中的液体,用PBST洗3次,将酶标板倒置在吸水纸上拍干;加入酶标二抗,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟;甩出孔中的液体,用PBST洗板3次,拍干;取A液和B液等体积混匀,每孔加100 μ L,避光显色10~15分钟,加入终止液终止反应,酶标仪上测定各孔在波长为450nm处的OD值。

[0090] 将含0ng/mL标准品孔的OD值减去含最大浓度标准品孔的OD值定为B₀,其余孔经同样方法校正后的OD值定为B;以B/B₀值为纵坐标,相应标准品浓度为横坐标,绘制噬虫毒素标准抑制曲线(图1)。根据曲线的回归方程可以求出对应样品的浓度,也可以求出噬虫毒素抑制中浓度IC₅₀(B/B₀=50%)及最小检测限IC₁₀(B/B₀=90%)。通过曲线方程($y = y_0 + a / [1 + (x/x_0)^b]$)可计算得到其IC₅₀为37ng/mL,检测线性范围(IC₂₀-IC₈₀)为11-477ng/mL,最低检测限IC₁₀为4ng/mL。曲线方程中, $y_0 = -0.0272$, $a = 1.0300$, $b = 0.8514$, $x_0 = 32.5027$ 。

[0091] 实际样品检测过程中,酶标板孔壁上吸附的包被抗原(包被浓度为100ng/mL)和待测噬虫毒素样品相互竞争与抗体反应,竞争结果通过显色反应出来。检测已知浓度的噬虫毒素并绘制标准抑制曲线,即可推算出待测噬虫毒素的浓度。

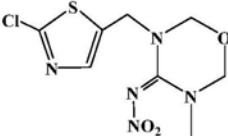
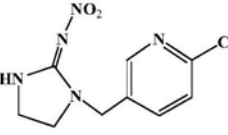
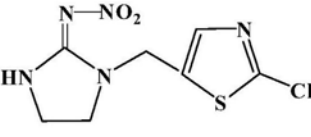
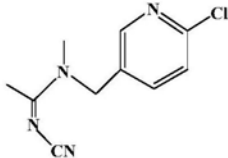
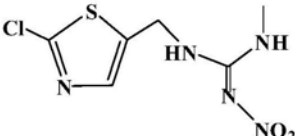
[0092] 本发明的优点在于能够准确灵敏地检测水体、蔬菜和水果中的噻虫嗪残留,克服了仪器检测中样品前处理过程繁琐、操作复杂耗时等缺点,同时大大节约了检测成本。

[0093] 实施例7抗噻虫嗪单链抗体的特异性考察

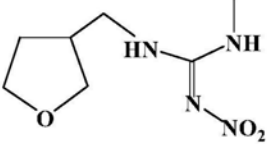
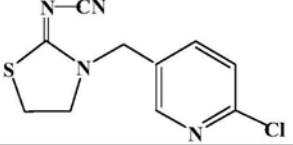
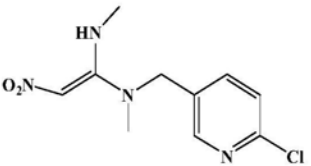
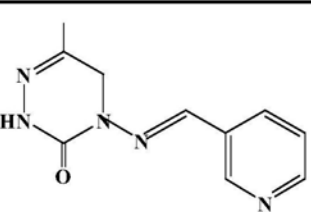
[0094] 选用交叉反应率评价SEQ ID NO:1抗体对噻虫嗪的特异性,将包被抗原包被于96孔酶标板上,每个孔包被浓度为100ng/mL,4℃过夜反应;次日,甩出孔中的液体,用含0.05%吐温的PBST洗3次,将酶标板倒置在吸水纸上拍干;加入封闭液,37℃孵育30分钟,甩出孔中的液体,用0.05%PBST洗3次,将酶标板倒置在吸水纸上拍干;分别配制0ng/mL,1ng/mL,4ng/mL,12ng/mL,37ng/mL,111ng/mL,333ng/mL,1000ng/mL的噻虫嗪、吡虫啉、氯噻啉、啉虫脒、噻虫胺、呋虫胺、噻虫啉、烯啶虫胺和吡蚜酮标准液,加入50μL标样到各孔中,进行2~4个重复,加入50μL稀释的抗体,37℃孵育30分钟;甩出孔中的液体,用PBST洗3次,将酶标板倒置在吸水纸上拍干;加入酶标二抗,37℃孵育30分钟;甩出孔中的液体,用PBST洗板3次,拍干;取A液和B液等体积混匀,每孔加100μL,避光显色10~15分钟,加入终止液终止反应,酶标仪上测定各孔在波长为450nm处的OD值。分别计算出每一种待测类似物的IC₅₀值,利用公式,交叉反应率=[IC₅₀(噻虫嗪)/IC₅₀(类似物)]×100%,可计算出交叉反应率。实验结果表明,该SEQ ID NO:1与噻虫嗪结构类似物交叉反应率小于0.5%,说明该抗体对噻虫嗪具有良好的特异性(表1)。

[0095] 表1抗噻虫嗪单链抗体的特异性考察

[0096]

类似物	结构式	交叉反应率
噻虫嗪		100%
吡虫啉		<0.05
氯噻啉		<0.05
啉虫脒		<0.05
噻虫胺		<0.05

[0097]

呋虫胺		<0.05
噻虫啉		<0.05
烯啶虫胺		<0.05
吡蚜酮		<0.05

[0098] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

序列表

<110> 中国农业大学

<120> 一种适用于噻虫嗪残留分析的scFv-ELISA试剂盒

<130> KHP191114321.3

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 239

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly Gly
1           5           10           15
Leu Ser Leu Ile Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Thr Tyr Ala
          20           25           30
Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
          35           40           45
Ser Ile Tyr Ser Gly Ser Tyr Thr Trp Tyr Ala Ala Val Lys Gly Arg
          50           55           60
Ala Thr Ile Ser Lys Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg Leu Gln Leu
65           70           75           80
Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Lys Cys
          85           90           95
Ala Tyr Ser Gly Cys Val His Arg Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr
          100          105          110
Glu Val Ile Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
          115          120          125
Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn
          130          135          140
Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn
145          150          155          160
Trp Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr
          165          170          175
Val Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Asn Ile Pro Ser Arg Phe
          180          185          190
Ser Gly Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val
          195          200          205
Gln Val Glu Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ser Ile Asp Asn Phe

```

210						215						220							
Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Leu	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His
225						230						235							

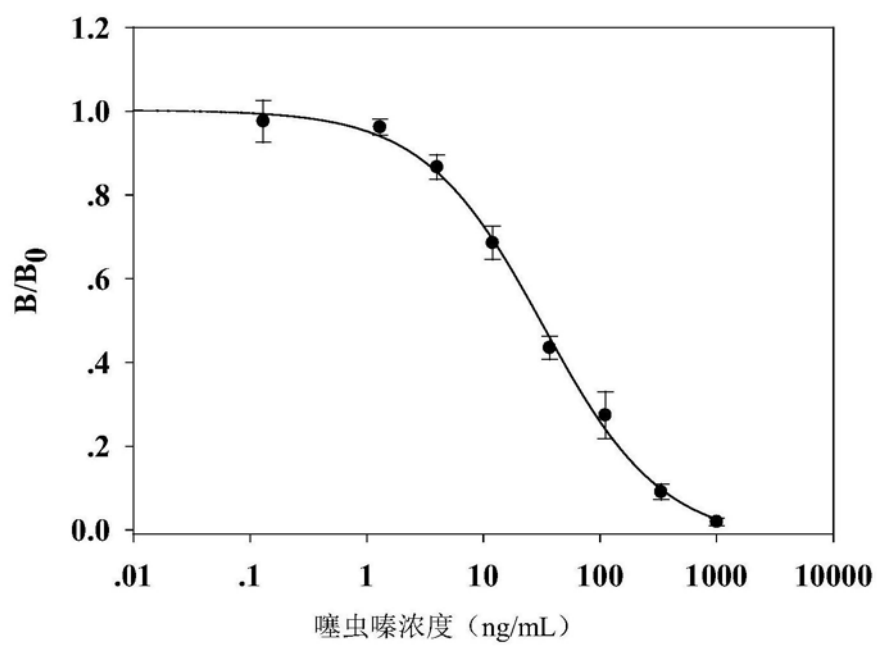


图1

专利名称(译)	一种适用于噻虫嗪残留分析的scFv-ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN110684080A	公开(公告)日	2020-01-14
申请号	CN201910791323.X	申请日	2019-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	许艇 何金鑫 徐波杰 王楷 李季		
发明人	许艇 何金鑫 徐波杰 王楷 李季		
IPC分类号	C07K14/00 C07K14/765 C07K14/795 C07K14/77 C07K14/435 C12N15/11 C07D417/06 G01N33/53		
CPC分类号	C07D417/06 C07K14/00 C07K14/435 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 G01N33/5308 G01N2030/065		
代理人(译)	黄爽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种适用于噻虫嗪残留分析的scFv-ELISA试剂盒。所述试剂盒包括盒体、设在盒体内的酶标板以及试剂；其中，酶标板的每个孔包被有噻虫嗪包被抗原，所述试剂包括抗噻虫嗪单链抗体、噻虫嗪标准溶液、酶标记的二抗、缓冲液PBS、洗涤液PBST、底物液、显色液和反应终止液等。检测过程中，酶标板孔壁上吸附的包被抗原和待测噻虫嗪相互竞争与抗体反应，通过显色反应观察结果。检测已知浓度的噻虫嗪并绘制标准曲线，可以推算出待测噻虫嗪的浓度。本发明的优点在于能够准确灵敏地检测水体、蔬菜和水果中的噻虫嗪残留，克服了仪器检测中样品前处理过程繁琐、操作复杂耗时等缺点，同时大大节约了检测成本。

