



# (12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109824784 A

(43)申请公布日 2019.05.31

(21)申请号 201910104627.4

C07C 39/367(2006.01)

(22)申请日 2019.02.01

C12R 1/01(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 吴纱 田杰生 薛衍乐

(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 王文君 黄爽

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C07C 37/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

序列表4页 附图1页

## (54)发明名称

纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物及其制备方法与应用

## (57)摘要

本发明提供一种纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物及其制备方法与应用。将纳米抗体-磁小体膜蛋白融合基因插入到自杀质粒的多克隆位点处得到重组质粒,将重组质粒转移至野生型磁螺菌中,获得的重组磁螺菌即可在磁小体膜上展示靶标纳米抗体(免疫磁珠复合物)。所述免疫磁珠复合物同时具有磁性分离和对相应抗原识别的双重功能,不仅可用于目标抗原的ELISA检测及应用,还可以用于目标抗原的吸附和富集。本发明基于基因工程技术制备出纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物,相较传统的化学偶联方法具有生产成本低、周期短、易于纯化等明显优势。

1. 纳米抗体-磁小体融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白是由纳米抗体与磁小体膜蛋白之间直接串联连接或通过柔性Linker可操作地连接构成;

其中,所述纳米抗体是利用噬菌体展示技术获得的纳米抗体;所述磁小体膜蛋白来自于趋磁细菌。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述纳米抗体为四溴双酚A特异性纳米抗体,其氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示;

所述磁小体膜蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

3. 编码权利要求1或2所述融合蛋白的基因。

4. 一种聚核苷酸,其特征在于,其核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示。

5. 含有权利要求3所述基因或权利要求4所述聚核苷酸的生物材料,所述生物材料包括重组DNA、表达盒、转座子、质粒载体、噬菌体载体、病毒载体或工程菌。

6. 重组磁螺菌,其特征在于,将权利要求3所述基因或权利要求4所述聚核苷酸通过质粒转移进磁螺菌中或通过基因工程手段整合到磁螺菌染色体上;

优选地,所述磁螺菌为*Magnetospirillum gryphiswaldense*,更优选*M.gryphiswaldense* MSR-1。

7. 根据权利要求6所述的重组磁螺菌,其特征在于,所述重组磁螺菌的构建方法如下:将SEQ ID NO:5所示的聚核苷酸构建到pK18mobSacB载体的多克隆位点处,所得重组载体转移进*M.gryphiswaldense* MSR-1,筛选重组子即得。

8. 纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物,其特征在于,所述免疫磁珠复合物是通过对权利要求6或7所述的重组磁螺菌进行培养,并从培养物中通过磁性吸附得到的。

9. 利用权利要求6或7所述重组磁螺菌制备纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物的方法,其特征在于,包括在发酵培养基中对所述重组磁螺菌进行培养,并从培养物中通过磁性吸附得到纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物;

优选地,所述方法包括离心收集菌体,然后重悬,超声破碎,最后通过磁性吸附得到纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物。

10. 权利要求8所述免疫磁珠复合物的以下任一应用:

1) 用于四溴双酚A的检测、吸附、净化;

2) 用于制备四溴双酚A的检测试剂或试剂盒。

## 纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程领域,具体地说,涉及纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 目前制备功能性蛋白-磁性颗粒的方法均为化学偶联法,所用的磁性颗粒一般由人工化学合成,反应步骤繁杂,反应条件苛刻,即先是内核材料的合成,再将内核材料包埋在壳中,整个过程需要严格的控制温度和pH。内核磁性颗粒可以通过共沉淀的方法,这个需要高的pH(pH=10),也可以通过温度在80-350℃的热分解法、溶胶凝胶法、水浴法等。可以采用表面活性剂组装到内核的表面,形成壳,表面活性剂有十二烷基硫酸钠、十六烷基三甲基溴化铵等。

[0003] 磁小体(magnetosome)是趋磁细菌(magnetotactic bacteria)胞内合成的磁性纳米粒子。磁小体的合成受基因的程序性控制,是一系列有序的酶在特定的生理环境下催化合成的产物,因此,磁小体的形状、大小、化学成分等都非常单一。微生物可以视为廉价的纳米磁性颗粒制造厂,它们所需的原始材料只有简单的碳源、氮源等,因此,磁小体的合成方便且环保。

[0004] 交联剂是将靶标蛋白偶联到化学合成的纳米颗粒表面的必需品,常用的化学交联剂有:戊二醛、碳化二亚胺盐酸盐等。磁小体是由微生物合成的,由磷脂双分子层包裹的内部为 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 的磁性颗粒。外膜的包裹,即磁小体膜,使磁小体具备很好的分散性。磁小体的粒径一般分布在40-50nm之间,介于单磁畴范围,比人工合成的载药磁颗粒小1-20倍。丰富的膜蛋白镶嵌在磁小体膜的磷脂双分子层中,它们均可以作为外源蛋白、核酸、药物等的载体。其中,约有20种膜蛋白是趋磁细菌所特有的。上述两点说明了磁小体比人工合成的磁颗粒更具有优势。因此,磁小体在很多领域都表现出了潜在的应用价值,例如作为核酸和蛋白质大分子物质的载体、免疫分析、药物载体、磁共振成像、磁热疗、生物催化剂、信息存储等。

[0005] 纳米抗体是单域抗体,分子量约为14KD,大小约在2-4nm之间,是骆驼科动物体内重链抗体能够识别抗原的区域,即仅由一条短的核苷酸编码。因此,纳米抗体除了具备普通抗体的亲和力、特异性等优点,同时还具备稳定性高、分子量小、水溶性强、易于生物技术操作等优点。在医学研究中,纳米抗体除了可以作为药物,用于治疗炎症、神经性疾病、抗肿瘤、病毒中和制剂等;还可以作为药物的载体,融合到纳米颗粒上,制备迅速诊断的试剂盒、融合到低聚物蛋白上诊断病毒、偶联到蛋白上治疗人类的寄生虫病等;在基础应用中,纳米抗体可以作为蛋白的结合剂、无序蛋白和大分子复合物的分子伴侣等。另外,纳米抗体也被视为环境检测的工具,用以分析环境中的小分子污染物。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物及其制备方法与应用。

[0007] 本发明构思如下：本发明以同源双交换的方法将外源基因整合到宿主菌(磁螺菌)的基因组上,选择的锚定蛋白为MamC,表达菌株在培养时无需外加抗生素,外源基因的转录和表达相较质粒稳定。本方法首次将能够识别环境中小分子污染物的纳米抗体展示在磁小体的表面。

[0008] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供一种纳米抗体-磁小体融合蛋白,所述融合蛋白是由纳米抗体与磁小体膜蛋白之间直接串联连接或通过柔性Linker可操作地连接构成。

[0009] 其中,所述纳米抗体是利用噬菌体展示技术获得的能够特异性识别抗原的纳米抗体。所述磁小体膜蛋白来自于趋磁细菌。

[0010] 优选地,所述纳米抗体为四溴双酚A特异性纳米抗体,其氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,编码所述纳米抗体的基因序列如SEQ ID NO:4所示。

[0011] 优选地,所述磁小体膜蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,编码所述膜蛋白的基因序列如SEQ ID NO:1所示。

[0012] 更优选地,所述纳米抗体-磁小体融合蛋白为四溴双酚A特异性纳米抗体-磁小体膜蛋白的融合蛋白。可将所述融合蛋白中的四溴双酚A特异性纳米抗体替换成具有识别其他抗原功能的纳米抗体。

[0013] 第二方面,本发明提供编码所述融合蛋白的基因,即纳米抗体-磁小体膜蛋白融合基因。

[0014] 第三方面,本发明提供一种聚核苷酸(融合基因),包含磁小体膜蛋白基因的上游序列、磁小体膜蛋白基因、纳米抗体基因和磁小体膜蛋白基因的下游序列。所述融合基因的结构如下:磁小体膜蛋白基因的上游序列-磁小体膜蛋白基因-纳米抗体基因-磁小体膜蛋白基因的下游序列,或者,磁小体膜蛋白基因的上游序列-纳米抗体基因-磁小体膜蛋白基因-磁小体膜蛋白基因的下游序列。

[0015] 优选地,所述磁小体膜蛋白基因的上游序列如SEQ ID NO:2所示,所述磁小体膜蛋白基因的下游序列如SEQ ID NO:3所示。

[0016] 更优选地,所述聚核苷酸的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示。

[0017] 第四方面,本发明提供含有所述融合蛋白基因或所述聚核苷酸的生物材料,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、病毒载体或工程菌。

[0018] 优选地,本发明利用质粒pK18mobSacB构建所述融合蛋白基因的表达载体。即,将纳米抗体-磁小体膜蛋白融合基因插入到自杀质粒的多克隆位点处得到的重组质粒。

[0019] 第五方面,本发明提供一种重组磁螺菌,将所述融合蛋白基因或所述聚核苷酸通过质粒转移进磁螺菌中或通过基因工程手段整合到磁螺菌染色体上。

[0020] 优选地,所述磁螺菌为*Magnetospirillum gryphiswaldense*,更优选*M.gryphiswaldense* MSR-1。

[0021] 所述重组磁螺菌的构建方法如下:将SEQ ID NO:5所示的聚核苷酸构建到pK18mobSacB载体的多克隆位点处,所得重组载体转移进*M.gryphiswaldense* MSR-1,筛选重组子即得。

[0022] 第六方面,本发明提供了一种重组菌株及其构建方法,该重组菌株合成的纳米磁

小体表面能够展示纳米抗体。具体为将纳米抗体基因与磁小体膜蛋白基因进行融合,融合基因插入到自杀质粒的多克隆位点处得重组质粒,将重组质粒转移至野生型磁螺菌中,获得的重组磁螺菌即可在磁小体膜上展示靶标纳米抗体。

[0023] 进一步地,本发明提供基于基因工程技术制备纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物的方法,包括以下步骤:

[0024] 1、构建携带锚定蛋白基因上游臂基因、纳米抗体-锚定蛋白的融合基因、锚定蛋白基因下游臂基因的重组自杀质粒;

[0025] 2、通过双亲接合实验将上述重组自杀质粒转移至野生型*M.gryphiswaldense*中,依次通过抗生素和蔗糖筛选,由菌落PCR验证以及磁响应验证确定筛选获得的阳性克隆菌株;

[0026] 3、将上述筛选获得的阳性克隆菌株经乳酸钠培养基摇瓶培养或深层发酵培养,收集细胞菌体,超声破碎细胞,磁性分离,PBS清洗得到高纯度纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物。

[0027] 第七方面,本发明提供一种纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物,所述免疫磁珠复合物是通过对所述重组磁螺菌进行培养,并从培养物中通过磁性吸附得到的。

[0028] 第八方面,本发明提供利用所述重组磁螺菌制备纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物的方法,包括在发酵培养基中对所述重组磁螺菌进行培养,并从培养物中分离纯化纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物。

[0029] 进一步地,所述方法包括离心收集菌体,然后重悬,超声破碎,最后通过磁性吸附得到纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物。

[0030] 在本发明的一个具体实施方式中,所述四溴双酚A特异性纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物的制备方法如下:

[0031] (1) PCR扩增分别得磁小体膜蛋白基因SEQ ID NO:1、所述磁小体膜蛋白基因的上游基因SEQ ID NO:2、所述磁小体膜蛋白基因的下游基因SEQ ID NO:3以及纳米抗体基因SEQ ID NO:4,通过融合PCR技术将SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:3拼接得到融合基因SEQ ID NO:5。将融合基因SEQ ID NO:5插入到pMD19-T simple载体中,并转化进*E.coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞中,挑取单菌落测序,获得正确序列的融合基因SEQ ID NO:5;

[0032] (2) 利用限制性内切酶酶切得到pMD19-T simple载体上的SEQ ID NO:5序列,插入到具有相同酶切位点的pK18mobSacB载体的多克隆位点处,构建得到的重组质粒转化*E.coli* S17-1感受态细胞;

[0033] (3) 将步骤(2)中供体菌*E.coli* S17-1胞内的重组质粒转移至野生型*M.gryphiswaldensense* MSR-1中,依次于抗生素和蔗糖存在的条件下筛选出融合基因整合到*M.gryphiswaldensense* MSR-1基因组上的重组菌株。在乳酸钠培养基摇瓶培养的条件下或深层培养的条件下培养重组菌株,高功率超声破碎细胞提取纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物,PBS液(pH7.4)重悬,低功率超声清洗、磁性吸附,得高纯度的纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物。

[0034] 前述的方法,步骤(1)中用于扩增SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的PCR反应体系为:2 $\times$ pfu Mix 25 $\mu$ l;正向引物1.25 $\mu$ l;反向引物1.25 $\mu$ l;双蒸水

21.25 $\mu$ l;模板DNA 1.25 $\mu$ l。反应条件为:预变性95 $^{\circ}$ C5min;变性95 $^{\circ}$ C30s,退火55 $^{\circ}$ C-65 $^{\circ}$ C,延申72 $^{\circ}$ C30s或1min,30个循环;最终延伸72 $^{\circ}$ C10min;保存25 $^{\circ}$ C1min。

[0035] 用于扩增SEQ ID NO:1的正向引物为:GATCTGGTGGCGGCGGTTCGGTGGCGGTGGCAGCTTTCAACTTGCCTTAC;反向引物为:TCAGGCCAATTCTTCCCTCAG;用于扩增SEQ ID NO:2的正向引物为:CCGGAAATTCGGCGCAGTTTCTCTCAGG;反向引物为:GAGCTGCAACTGCATCATCGCTGTTGTCCT;用于扩增SEQ ID NO:3的正向引物为:TGAGGGAAGAATTGG;反向引物为:GCTCTAGAAGAACAAGGCAGAGGCGAT;用于扩增SEQ ID NO:4的正向引物为:ATGCAGTTGCAGCTCGTGGAG;反向引物为:AACCGCCGCCACCAGATCCACCACCGCCGGAA TGGTGATGGTATGATGGTC。

[0036] 前述的方法,步骤(2)中用于扩增SEQ ID NO:5的PCR反应体系为:2 $\times$ pfu Mix 25 $\mu$ l;正向引物0.5 $\mu$ l;反向引物0.5 $\mu$ l;双蒸水23.5 $\mu$ l;模板DNA 0.5 $\mu$ l。反应条件为:预变性95 $^{\circ}$ C5min;变性95 $^{\circ}$ C30s,退火55 $^{\circ}$ C-65 $^{\circ}$ C,延申72 $^{\circ}$ C2.5min,30个循环;最终延伸72 $^{\circ}$ C10min;保存25 $^{\circ}$ C1min。

[0037] 用于扩增SEQ ID NO:5的正向引物为:CCGGAATTCGGCGCAGTTTCGTCTCAGG;反向引物为:GCTCTAGAAGAACAAGGCAGAGGCGAT。

[0038] 前述的方法,步骤(2)中使用的限制性内切酶分别为:EcoR I和Xba I。

[0039] 前述的方法,步骤(3)中使用的抗生素为卡那霉素,蔗糖浓度为10%。

[0040] 步骤(3)超声破碎的高功率为200-300W;低功率为40-100W。

[0041] PBS液的配方为:7.9g NaCl,0.2g KCl,0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,1.8g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,pH 7.4。

[0042] 第九方面,本发明提供所述纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物的以下任一应用:

[0043] 1)用于四溴双酚A的检测、吸附、净化等;

[0044] 2)用于制备四溴双酚A的检测试剂或试剂盒。

[0045] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0046] (一)采用本发明方法构建获得的重组磁螺菌合成的磁小体表面展示着功能性纳米抗体,该复合物同时具有磁性分离和对相应抗原识别的双重功能。不仅可用于目标抗原的ELISA检测及应用,还可以用于目标抗原的吸附和富集。本发明基于基因工程技术制备出纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物,相较传统的化学偶联方法具有生产成本低、周期短、易于纯化等明显优势。

[0047] (二)本发明构建获得的重组磁螺菌控制融合基因的转录和表达的元件仍是原基因组上的控制元件,重组菌培养方法简单、易于操作,培养过程中无需外加抗生素,合成的磁小体表面展示着功能性的纳米抗体,该纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物的获得只需简单的超声破碎细胞以及磁性分离,即可获得高纯度的产物。该复合物同时具有磁性分离和纳米抗体特异性识别的双重功能。

[0048] (三)本发明解决了传统化学偶联功能性蛋白-磁颗粒生产成本低、生产周期长、批次间差异大等问题,同时在医学活体无损监测、药物研发等领域具有重要的现实意义。

[0049] (四)本发明提供的特异性识别小分子四溴双酚A的纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物,基于此复合物可以开发针对小分子污染物四溴双酚A的免疫检测、净化、吸附等产品,应用前景广阔。

## 附图说明

[0050] 图1为本发明实施例2中重组磁螺菌的电镜照片。图中黑色小颗粒为特异性识别小分子四溴双酚A的纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物。

[0051] 图2为本发明实施例5中采用一步法ELISA利用纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物检测小分子四溴双酚A的结果。

## 具体实施方式

[0052] 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。

[0053] 实施例1 重组自杀质粒的构建

[0054] 1、利用表1引物、高保真pfu酶,分别PCR扩增mamC上游臂基因、mamC基因、mamC下游臂基因以及抗四溴双酚A的纳米抗体基因。PCR体系和条件如下:

[0055] PCR体系 (50 $\mu$ l):

2  $\times$  pfu Mix 25  $\mu$ l

正向引物 0.5  $\mu$ l

[0056] 反向引物 0.5  $\mu$ l

模板 0.5  $\mu$ l

ddH<sub>2</sub>O 23.5  $\mu$ l

[0057] PCR条件 (变性 $\rightarrow$ 退火 $\rightarrow$ 延伸:30个循环):

预变性 95  $^{\circ}$ C 5 min

变性 95  $^{\circ}$ C 30 s

退火 55  $^{\circ}$ C-65  $^{\circ}$ C 30 s

[0058] 延伸 72  $^{\circ}$ C 30 s或1 min

最终延伸 72  $^{\circ}$ C 10 min

保存 25  $^{\circ}$ C 1 min

[0059] 表1PCR扩增所用引物

[0060]

引物名称		序列 (5'→3')	酶切位点
<i>mamC</i> 上游 臂基因	正向引物1	<u>CCGGAATTC</u> GGCGCAGTTTCGTCTCAGG	<i>EcoR</i> I
	反向引物2	GAGCTGCAACTGCATCATCGCTGTTGTCCT	
<i>mamC</i> 基因	正向引物3	GATCTGGTGGCGGCGGTTCCGGTGGCGGTGGCA	
	反向引物4	GCTTTCAACTTGCGCCGTAC	
纳米抗体 基因	正向引物5	TCAGGCCAATTCTTCCCTCAG	
	反向引物6	ATGCAGTTGCAGCTCGTGGAG	
<i>mamC</i> 下游 臂基因	正向引物7	AACCGCCGCCACCAGATCCACCACCGCCGGAAT	
	反向引物8	GGTGATGGTGATGATGGTC	
<i>mamC</i> 下游 臂基因	正向引物7	TGAGGGAAGAATTGG	
	反向引物8	GCTCTAGAAGAACAAGGCAGAGGCGAT	
			<i>Xba</i> I

[0061] 注:下划线为酶切位点序列。

[0062] 2、按照天根生化科技(北京)有限公司的琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒的说明书将步骤1中的PCR扩增产物进行切胶回收:

[0063] 3、采用融合PCR技术将步骤2中回收获得的各基因片段进行3步融合PCR扩增：

[0064] 首先是纳米抗体基因与mamC基因的融合扩增得融合基因1,反应体系和条件如下:

[0065] PCR体系 (50 $\mu$ l) :

2 × pfu Mix	25 µl
-------------	-------

正向引物5	0.5 μl
-------	--------

[0066] 反向引物4 0.5  $\mu$ l

纳米抗体基因和 <i>mamC</i> 基因	0.5 $\mu$ l (摩尔比为1: 1)
------------------------	------------------------

ddH<sub>2</sub>O 23.5 μl

[0067] PCR条件(变性→退火→延伸;30个循环):

预变性      95 °C      5 min

变性            95 °C            30 s

退火 55 °C-65 °C 30 s

[0068] 延伸 72 °C 1 min

最终延伸      72 °C      10 min

保存            25 °C            1 min

[0069] 接着是融合基因1与mamC上游臂基因的融合得融合基因2,反应体系和条件如下:

[0070] PCR体系 (50 $\mu$ l) :

2 × pfu Mix	25 µl
-------------	-------

正向引物1	0.5 μl
-------	--------

[0071]	反向引物6	0.5 $\mu$ l
--------	-------	-------------

融合基因1和 <i>mamC</i> 上游臂基因	0.5 $\mu$ l (摩尔比为1: 1)
--------------------------	------------------------

ddH<sub>2</sub>O 23.5 μl

[0072] PCR条件(变性→退火→延伸:30个循环):

预变性 95 °C 5 min

变性 95 °C 30 s

[0073] 退火 55 °C-65 °C 30 s

延伸 72 °C 1.5 min

最终延伸 72 °C 10 min

[0074] 保存 25 °C 1 min

[0075] 随后是融合基因2与mamC下游臂基因的融合得融合基因TBC,反应体系和条件如下:

[0076] PCR体系(50μl):

2 × pfu Mix 25 μl

正向引物1 0.5 μl

[0077] 反向引物8 0.5 μl

融合基因2和mamC下游臂基因 0.5 μl (摩尔比为1: 1)

ddH<sub>2</sub>O 23.5 μl

[0078] PCR条件(变性→退火→延伸:30个循环):

预变性 95 °C 5 min

变性 95 °C 30 s

[0079] 退火 55 °C-65 °C 30 s

延伸 72 °C 2.5 min

最终延伸 72 °C 10 min

保存 25 °C 1 min

[0080] 最后是将TBC融合基因的3'末端加上“A”,供后续实验备用,即在上述反应体系中加10μl的2×Taq PCR Mix于72°C条件下反应30min。

[0081] 4、将步骤3中的融合基因TBC连接到pMD19-T simple (购自TaKaRa) 质粒上,通过化学转化的方法,将连接产物转化进DH5α细胞中,涂布于含有氨苄抗生素的LB固体平板进行筛选,挑取单克隆,菌落PCR验证后,送公司测序,验证融合基因的正确性。

[0082] 融合基因TBC连接到pMD19-T simple上的反应体系为:4.5μl PCR产物;5μl Solution I;0.5μl pMD19-T simple。

[0083] 融合基因TBC连接到pMD19-T simple上的反应条件为:16°C2h。

[0084] LB培养基的配方(1L):10g蛋白胨;5g酵母粉;10g NaCl;15g琼脂粉。

[0085] 5、EcoR I和Xba I (购自TaKaRa) 双酶切得TBC基因片段和pK18mobSacB载体片段。

[0086] 酶切体系:

- |        |  |            |
|--------|--|------------|
|        | <i>EcoR</i> I  | 5 $\mu$ l  |
|        | <i>Xba</i> I   | 5 $\mu$ l  |
| [0087] | 10 $\times$ M buffer                                     | 10 $\mu$ l |
|        | Plasmid  | 40 $\mu$ l |
| [0088] | ddH <sub>2</sub> O                                       | 40 $\mu$ l |
| [0089] | 反应条件:37℃,约3h。  |            |
| [0090] | 6、T4DNA Ligase (购自TaKaRa) 连接TBC与pK18mobSacB得重组质粒pKuTBCd。 |            |
| [0091] | 连接体系:  |            |

- |        |                      |           |
|--------|----------------------|-----------|
|        | T4 DNA Ligase buffer | 2 $\mu$ l |
|        | T4 DNA Ligase        | 1 $\mu$ l |
| [0092] | TBC基因片段              | 6 $\mu$ l |
|        | pK18mobSacB载体片段      | 3 $\mu$ l |
|        | ddH <sub>2</sub> O   | 9 $\mu$ l |

[0093] 反应条件:16℃,约20h。

[0094] 7、最后将重组质粒通过化学转化的方法,转化进供体菌株*E.coli* S17-1中。

[0095] 实施例2 重组表达菌株的筛选

[0096] 1、通过双亲接合实验将实施例1中供体菌株*E.coli* S17-1胞内的重组质粒pKuTBCd转化至受体菌株*M.gryphiswaldensense* MSR-1中。具体为:1) S17-1单菌落接种于4ml液体LB中,37℃,200rpm培养过夜;2) S17-1按10%的比例接种于无抗生素的液体LB中(200 $\mu$ l S17-1+2ml LB),30℃,150rpm,培养3h;3) MSR-1在乳酸钠培养基中活化2次,第三次培养至OD<sub>565</sub>为0.8-1.0;4) 分别取2) 中300 $\mu$ l S17-1和3) 中1ml MSR-1进行混合,12,000rpm离心1min,在超净工作台中弃上清;5) 用1ml谷氨酸钠选择性培养基洗菌体,12,000rpm离心1min,在超净工作台中弃上清,重复一次;6) 用50 $\mu$ l谷氨酸钠选择培养基重悬5) 中的菌体,然后将菌体重悬液滴在没有抗生素的谷氨酸钠固体选择性培养基上的微孔滤膜上,Parafilm封口,于30℃正置接合过夜;7) 用1ml谷氨酸钠选择性培养基洗下微孔滤膜上的菌体,于30℃,100rpm的摇床中复壮2h;8) 12,000rpm离心1min,留约100 $\mu$ l的上清重悬菌体,并将重悬好的菌体涂于含有卡纳抗生素的谷氨酸钠固体选择培养基上,Parafilm封口,于30℃恒温箱中,正置培养5-7天。

[0097] 乳酸钠培养基的配方(1L):

	乳酸钠 (50 %- 60 %)	4.5 g
	NH <sub>4</sub> Cl	0.4 g
	MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.1 g
[0098]	酵母粉	0.1 g
	硫代乙醇酸钠	0.05 g
	0.01 M柠檬酸铁溶液	2 ml
	矿质元素混合液	5 ml

[0099] 注：半固体培养基中加入终浓度为0.2%的琼脂粉；固体培养基中加入终浓度为1.5%的琼脂粉。

[0100] 矿质元素混合液的配方 (1L)：

	氨三乙酸	1.5 g
	MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	3 g
	硫酸锰	0.5 g
	氯化钠	1 g
	硫酸亚铁	0.1 g
	硫酸钴	0.18 g
	氯化钙	0.1 g
	七水合硫酸锌	0.18 g
	五水合硫酸铜	0.01 g
	十二水合硫酸铝钾	0.02 g
	硼酸	0.01 g
[0101]	二水合钼酸钠	0.01 g
	六水合氯化镍	0.025 g
	五水合亚硒酸钠	0.3 mg

谷氨酸钠选择性培养基配方 (1 L)：

	乳酸钠 (50 %-60 %)	3.5 g
	L-谷氨酸钠	4 g
	MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.1 g
	硫代乙醇酸钠	0.05 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
	0.01 M柠檬酸铁溶液	2 ml
	矿质元素混合液	4 ml

[0102] 注:固体培养基中加入终浓度为1.5%的琼脂粉。

[0103] 2、菌落PCR验证步骤1中的单克隆,挑取阳性单克隆先于含有卡纳抗生素的半固体乳酸钠培养基中进行穿刺培养,培养条件为:30℃恒温静置培养;接着将半固体培养基中的菌体转接到含有卡纳抗生素的50ml液体培养基中,培养条件为:30℃,100rpm振荡培养,这时得到的突变株为完整的重组质粒pKuTBCd整合到MSR-1基因组上的单交换菌株。

[0104] 3、将步骤2中的单交换菌株转接到只含有10%蔗糖的乳酸钠半固体培养基中,培养条件为:30℃恒温静置培养至出现菌体,这时长出来的菌可能为同源双交换的混合菌株,将这些混合菌株转接到无抗生素的50ml乳酸钠培养基中,培养条件为:30℃,100rpm振荡培养,待OD<sub>565</sub>为0.8-1.0时,于无抗生素的固体谷氨酸钠选择性培养基上稀释涂布或划线分离单菌落,最终通过菌落PCR验证得同源双交换的阳性单克隆,并对该菌株磁小体岛上的基因进行PCR验证和该菌株的磁响应验证(Cmag值),当磁小体岛上的基因没有丢失,且Cmag值在0.8-1.2之间,确定为成功构建的重组菌株,并将该重组菌株命名为TBC。重组磁螺菌的电镜照片见图1。

[0105] 实施例3 纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物的获得

[0106] 1、将实施例2中筛选得到的TBC菌株直接培养于无任何抗生素的乳酸钠培养基中,摇瓶培养,培养条件为30℃,100rpm,待细胞生长至稳定期,离心,收集细胞。

[0107] 2、取1g湿重的菌泥重悬于20ml的PBS (pH 7.4) 中,于200W超声3s,间歇5s的条件下超声破碎细胞40min,然后继续在40W的条件下,超声3s,间歇5s,超声40min以分散纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物表面非紧密结合的杂蛋白。

[0108] 3、将步骤2中的超声破碎液置于强力磁铁上,磁性吸附约2h分散纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物和细胞破碎液,弃上清。

[0109] 4、用等体积的PBS (pH 7.4) 重悬纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物,于40W超声3s,间歇5s,超声清洗30min,再置于强力磁铁上,磁性分离纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物和该复合物表面清洗掉的杂蛋白,即沉淀和上清。

[0110] 5、重复步骤4直至上清液的OD<sub>260</sub>和OD<sub>280</sub>低于0.05,即为纯化好的纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物,整个纯化过程1天内即可完成。

[0111] 本发明提供一种集成条件温和、重复性高、易于生产、定向展示等于一体的基于基因工程技术制备纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物(纳米抗体与磁小体膜蛋白定向偶联而成的免疫磁珠)的方法,该方法相较传统的化学偶联方法具有生产成本低、周期短、易于纯化等明显优势。

[0112] 实施例4 纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物分离纯化条件的优化

[0113] 1、重组菌TBC培养条件的确定:

[0114] 1) 将冻纯的重组菌TBC在乳酸钠普通培养基中连续活化两次;

[0115] 2) 按照10% (v/v) 的接种量分别接种于300mL乳酸钠培养基血清瓶中进行摇瓶培养和4.5L初始培养基发酵罐中进行发酵培养;

[0116] 3) 摇瓶培养条件为:30℃,100rpm;发酵罐发酵培养条件为:培养温度30℃,初始转速为100rpm,初始通气量为1L/min,补料与调节pH偶联使pH保持在6.9。随着细胞的生长氧气消耗增多,溶氧逐渐下降,当溶氧首次降至15%-30%之间时,手动调节通气量(增加一倍),当溶氧再次降低,并降至0.5%时,先维持转速100rpm约4-6h不变,细胞合成纳米抗体-

磁小体免疫磁珠复合物,之后,每2h提高10rpm,溶氧维持在0.5%;

[0117] 4) 两种培养条件下,均在磁响应 (Cmag值) 最高时收集细胞,提取细胞内的纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物,ELISA检测,最终确定发酵罐的发酵培养优于血清瓶的摇瓶培养。

[0118] 发酵培养的初始培养基的配方 (4.5L):

	乳酸钠 (50 %- 60 %)	4.0 g
	NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
	MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.2 g
[0119]	酵母粉	3.0 g
	矿质元素混合液	35 ml
	磷酸氢二钾	3.0g

[0120] 补料培养基 (500mL):

	乳酸	100.0 g
	饱和氨水	18 ml
	MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.2 g
[0121]	酵母粉	3.0 g
	三水氯化铁	2.0 g
	矿质元素混合液	35 ml
	磷酸氢二钾	3.0g

[0122] 2、纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物纯化条件的确定:

[0123] 1) 细胞重悬:按照1g菌泥:40mL缓冲液 (0.01M PBS pH 7.4) 的比例重悬菌体;

[0124] 2) 破碎细胞:

[0125] 方法I (常规方法):按照200W,工作3s,间歇5s,超声40min,然后依次降低超声功率为120W,100W,80W,60W,40W,其他不变,镜检确定细胞完全破碎,最后将破碎液静置在强力磁铁上 (4℃);

[0126] 方法II (优化方法):在200W,工作3s,间歇5s的条件下超声破碎细胞,直到镜检确定细胞完全破碎,然后将条件调整在40W,工作3s,间歇5s,再超声40min,之后将破碎细胞液静置在强力磁铁上 (4℃);

[0127] 3) 免疫磁珠复合物的纯化:

[0128] 方法I (常规方法):将步骤2) 中的产物去上清,用等体积的PBS (pH) 重悬沉淀,然后于40W,工作3s,间歇5s的超声波下清洗40min,最后静置在强力磁铁上 (4℃),为了确保纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物完全从上清中吸附到沉淀中,早晚各清洗一次,当上清的OD<sub>260</sub>和OD<sub>280</sub>低于0.05时,即为纯化好的纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物,停止清洗,耗时约一周;

[0129] 方法II (优化方法):将步骤2) 中的产物去上清,用等体积的PBS (pH) 重悬沉淀,然后于40W,工作3s,间歇5s的超声波下清洗40min,最后静置在强力磁铁上 (4℃),为了获得磁

性最好的纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物,并且降低复合物长时间放置在4℃造成的活性损失,待肉眼观察不到上清呈灰黑色即可进行下一次清洗,当上清的OD<sub>260</sub>和OD<sub>280</sub>低于0.05时,即为纯化好的纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物,停止清洗,磁性分离时间由最初的2h降低到30min,整个纯化过程在1天内即可完成;

[0130] 4) ELISA检测,最终确定细胞破碎以及复合物的纯化方法II均优于方法I。

[0131] 实施例5 纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物在四溴双酚A检测中的应用

[0132] 1、首先用1%的明胶将96孔酶标板于4℃静置封闭过夜;次日,用2%的BSA将实施例3中纯化获得的纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物置于振荡器上室温封闭3h。其中,用碳酸钠缓冲液(0.05M, pH 9.6)配制1%的明胶,用PBS缓冲液(0.01M, pH 7.4)配置2%的BSA。

[0133] 碳酸钠缓冲液的配方为(1L):1.59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.93g NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6。

[0134] 2、直接甩掉酶标板中的封闭液,用PBST洗涤3次,待用;磁性分离纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物与封闭液,同样用PBST洗涤3次,待用。

[0135] PBST:在PBS(0.01M, pH 7.4)中添加终浓度为0.05%的吐温20。

[0136] 3、PBS重悬纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物(终浓度为337.5ng/μL),并梯度添加到酶标板孔中,每个梯度设置一个对照组和一个实验组,磁性分离,弃PBS。

[0137] 浓度梯度:10μL;20μL;30μL;40μL;50μL。

[0138] 4、先在对照组的孔中添加50μL的PBS,在实验组的孔中添加50μL TBBPA(工作浓度为1000ng/mL)标准品;然后,再向各孔中添加50μL偶联有HRP标记的TBBPA衍生物T5(参见 Strong and oriented conjugation of nanobodies onto magnetosomes for the development of a rapid immunomagnetic assay for the environmental detection of tetrabromobisphenol-A, Jinxin He, et al., Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018),最后将酶标板置于振荡器上孵育1h。

[0139] 5、磁性分离,弃上清,并用PBST洗涤3次,各孔中添加100μL等体积混匀的A液和B液,避光显色10-15min,50μL 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,于酶标仪上测定OD<sub>450</sub>的值,结果表明(图2),纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物能够识别TBBPA。

[0140] A液(1L):1g过氧化脲,35.8g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O,10.3g柠檬酸,0.1mL吐温20。

[0141] B液(1L):0.7g TMB,10.3g柠檬酸,40mL无水DMSO。

[0142] 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:将22.2mL浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(98%)缓慢加入177.8mL蒸馏水中。

[0143] 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

&lt;110&gt; 中国农业大学

&lt;120&gt; 纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物及其制备方法与应用

&lt;130&gt; KHP191110473.7

&lt;160&gt; 7

&lt;170&gt; SIP0SequenceListing 1.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 375

&lt;212&gt; DNA

<213> 磁螺菌 (*Magnetospirillum gryphiswaldense*)

&lt;400&gt; 1

```

agctttcaac ttgcgccgta cttggcgaaa tccgtccctg gaatcggcac tctcggcggc 60
attgtcgggtg gcgccgccgc ccttgccaag aatgcccgc ttttgaagga caagcagata 120
accggcacag aagcggccat cgacaccggc aaggaagccg ccggcgccgg gcttgccacc 180
gctttctccg ccgtcgccgc caccgccgtc ggcggtgggt tgggtgtctc gttgggagcc 240
gccctaatacg ccggcgctgc cgccaaatac gcctgggacc tgggtgtcga tttcatcgag 300
aaggaattgc gtcacggcaa gtccgccgag gcgacagcgt ccgacgaaga cattctgagg 360
gaagaattgg cctga 375

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1009

&lt;212&gt; DNA

<213> 磁螺菌 (*Magnetospirillum gryphiswaldense*)

&lt;400&gt; 2

```

ggcgcagttt cgtctcagga aaggccaata ccatgcagga cttttttctc gccaaggtcg 60
aaagcgcacat gcaggcgtcc caggctcggg cacttgccgg tcagacggcg acggtctctg 120
cagtctcggc cacgaccaat ctggccacca taacccaac caccgccggg caggccccta 180
tcacgtcaca actggacgcg gcacggcagg tgacggagtt gcaggccctg atgggaaaga 240
ccgtgctgggt cggaaagacc ccgaccacca tcggcgccat cggaaactgg attgccttga 300
ccccggcggc gggagccaag accggcgctg ccgtggccgg aaccggtcag ctgggtcatga 360
tgaaggtcga gggcacggc gcggccatca agcttcccgc cctggcgggg aagagcttca 420
tcgtcgccca gcccccgta gccgccgga ccaaagcggc gggcatgctc tatctgaatc 480
cggttgccgg tggatgatg gtggccatca acattcagaa cgccatgacc cagaccggcg 540
gcttggtcgg caagacctc accgtcgccc ccagccccgt cattggcggc accaccggta 600
aattcctgggt cctgaagccc atggcgaccg gggtcggcaa ggcgggtggc agcggcgccg 660
tcgtcgccaa gttcgtaccc gccgccgta ccggcacggg cggagcggcg gctatcgggg 720
ccggatccgc caccacctg atggccacgg gcgccagta gatccccc gtcactgccg 780
ccgccgctgg cagcgccatg ctgacagcca aaggtgttgg cctcgggctt ggccctgggc 840
tcggcgccctg ggggccgttc gccctagggg ctatcgccct agcgggtgtt gtcgcgcttt 900

```

atacctgggc gcgccgccgc catggcgctc ccatgtttc ccatgacgt cttctggcgg 960  
ctgtcggcga ggaataagcc tgacccttga attaaggaca acagcatg 1009

<210> 3

<211> 539

<212> DNA

<213> 磁螺菌 (*Magnetospirillum gryphiswaldense*)

<400> 3

tgagggaaga attggcctga aatattgggc tggttcacgg cattcagaca ccggcggagg 60  
ccagggcgtt ggttgttata taaacaacgc cctggcagaa ccgaacaaga acactgtcgt 120  
cattcacccc gatgtgctct ctctgcccc ctctctgcct ctgaccgctg tgcccccgac 180  
agcggccatc cgcggggaac gtccgctgag gcccttgtgt gccaagaacg ggcattcatg 240  
atggcgccgc gccggcgtgg ggcgctccga tgccccttag gttcaatccg gggcgcgcac 300  
aatttcgttg gaagattacc cccagccaac ccgatcaaag atacgaatag attggacgtt 360  
gttctctccc aacatggcga cgttgatcgt ctctccttg aaatctcccc aggacgatac 420  
gagctgcgag cgcttggccc caggaagaac ggggaactcg ttgttggcct cggcgtaaaa 480  
ctgctgcgct tcggcccctg agaggaaact caccagcttg atcgccctctg cttgtttct 539

<210> 4

<211> 402

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

atgcagttgc agctcgtgga gtctggggga ggcttggcgc aacctggggg gtctctgaga 60  
ctctcctgtg cagcctctcg aagcatcttc agtacgtata ccatgggctg gtaccgccag 120  
cctccaggga gggggcgcca gttggcgcga gctagtaata gttttggtac cacatactac 180  
gcaaaactctg tgaagggccg attcgccatc tccagagaca atgccaagaa caccgtgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggctatgt attactgtac ggcacgcgac 300  
agaagcgacg cgactattcg tgtctggggc caggggaccc aggtcacctg ctctcagaa 360  
cccaagacac caaaaccaca agaccatcat caccatcacc at 402

<210> 5

<211> 2365

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

ggcgagttt cgtctcagga aaggccaata ccatgcagga cttttttctc gccaaagtcg 60  
aaagcgccat gcaggcgtcc caggtcgggg cacttgccgg tcagacggcg acggtctcgt 120  
cagtctcggc cagaccaat ctggccacca taaccccaac caccgccggg caggccccta 180  
tcatcgtcaa actggacgcg gcacggcagg tgacggagtt gcaggccctg atgggaaaga 240  
ccgtgctggt cggaaagacc ccgaccacca tcggcggcat cggaaactgg attgccttga 300  
ccccggcggc gggagccaag accggcgctg ccgtggccgg aaccggtcag ctggtcatga 360

tgaaggtcga gggcaccggc gcgccatca agcttcccgc cctggcgggt aagagcttca 420  
tcgtcgccca gcccccgta gccgccgga ccaaagcggc gggcatgctc tatctgaatc 480  
cggttggcgg tggatgatg gtggccatca acattcagaa cgccatgacc cagaccggcg 540  
gcttggtcgg caagacctc accgtcgccc ccagccccgt cattggcggc accaccggta 600  
aatccttggg cctgaagccc atggcgaccg gggtcggcaa ggcggtgggc agcggcgccg 660  
tcgtcgccaa gttcgtaccc gccgccgtca ccggcacggg cggagcggcg gctatcgggg 720  
ccggatccgc caccacctg atggccacgg gcgccagtag gatcaccccc gtcactgccg 780  
ccgccgctgg cagcgccatg ctgacagcca aaggtgttgg cctcgggctt ggcctggggc 840  
tcggcgccctg ggggcccgtt gccctagggg ctatcggcct agcgggtgtt gtcgcgcttt 900  
atacctgggc gcgccggcg catggcgctc ccgatgtttc cgatgacgct cttctggcgg 960  
ctgtcggcga ggaataagcc tgacccttga attaaggaca acagcgatga tgcagttgca 1020  
gctcgtggag tctgggggag gcttgggtgca acctgggggg tctctgagac tctcctgtgc 1080  
agcctctcga agcatcttca gtacgtatac catgggctgg taccgccagc ctccaggagg 1140  
ggggcgcgag ttggtcgag ctagtaatag ttttgggtacc acatactacg caaactctgt 1200  
gaagggccga ttcgccatct ccagagacaa tgccaagaac accgtgtatc tgcaaatgaa 1260  
cagcctgaaa cctgaggaca cggctatgta ttactgtacg gcacgcgaca gaagcgacgc 1320  
gactattcgt gtctggggcc aggggaccca ggtcacgcgc tcctcagaac ccaagacacc 1380  
aaaaccacaa gacggccagg ccggccagca ccatcacat caccattccg gcggtggtgg 1440  
atctgggtggc ggcggttccg gtggcggtgg cagctttcaa cttgcgccgt acttggcgaa 1500  
atccgtccct ggaatcggca ttctcggcgg cattgtcggg ggccgcccg cccttgccaa 1560  
gaatgcccgc cttttgaagg acaagcagat aaccggcaca gaagcggcca tcgacaccgg 1620  
caaggaagcc gccggcgccg ggcttgccac cgctttctcc gccgtcgccg ccaccgccgt 1680  
cggcggtggg ttggtggtct cgttgggagc cgccctaate gccggcgctc ccgccaaata 1740  
cgcttgggac ctgggtgtcg atttcatcga gaaggaattg cgtcacggca agtccgccga 1800  
ggcgacacgc tccgacgaag acattctgag ggaagaattg gcctgaaata ttgggctggt 1860  
tcacggcatt cagacaccgg cggaggccag ggcggttggt gttatctaaa caacgccctg 1920  
gcagaaccga acaagaacac tgtcgtcatt caccctgatg tgctctctct gccccactct 1980  
ctgcctctga ccgctgtgcc cccgacagcg gccatccggc gggaacgtcc gctgaggccc 2040  
ttgtgtgcca agaaccggga ttcatgatgg cgccgcgccg gcgtggggcg ctccgatgcc 2100  
ccttaggttc aatccggggc gcgcacaatt tcgttgaag attaccccca gccaacccga 2160  
tcaaagatac gaatagattg gacgttggtc tctcccaaca tggcgacgtt gatcgtctcc 2220  
tccttgaaat ctccccagga cgatacgagc tgcgagcgtc tggccccagg aagaacgggg 2280  
aactcgttgt tggcctcggc gtaaaactgc tgcgttcgg ccctgagag gaactccacc 2340  
agcttgatcg cctctgcctt gttct 2365

<210> 6

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

Met Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Phe Ser Thr  
                     20                      25                      30  
 Tyr Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Arg Glu Leu  
                     35                      40                      45  
 Val Ala Ala Ser Asn Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val  
                     50                      55                      60  
 Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
                     85                      90                      95  
 Thr Ala Arg Asp Arg Ser Asp Ala Thr Ile Arg Val Trp Gly Gln Gly  
                     100                      105                      110  
 Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr Pro Lys Pro Gln Asp  
                     115                      120                      125  
 His His His His His His  
                     130

<210> 7

<211> 124

<212> PRT

<213> 磁螺菌 (Magnetospirillum gryphiswaldense)

<400> 7

Ser Phe Gln Leu Ala Pro Tyr Leu Ala Lys Ser Val Pro Gly Ile Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Ile Leu Gly Gly Ile Val Gly Gly Ala Ala Ala Leu Ala Lys Asn Ala  
                     20                      25                      30  
 Arg Leu Leu Lys Asp Lys Gln Ile Thr Gly Thr Glu Ala Ala Ile Asp  
                     35                      40                      45  
 Thr Gly Lys Glu Ala Ala Gly Ala Gly Leu Ala Thr Ala Phe Ser Ala  
                     50                      55                      60  
 Val Ala Ala Thr Ala Val Gly Gly Gly Leu Val Val Ser Leu Gly Ala  
 65                      70                      75                      80  
 Ala Leu Ile Ala Gly Val Ala Ala Lys Tyr Ala Trp Asp Leu Gly Val  
                     85                      90                      95  
 Asp Phe Ile Glu Lys Glu Leu Arg His Gly Lys Ser Ala Glu Ala Thr  
                     100                      105                      110  
 Ala Ser Asp Glu Asp Ile Leu Arg Glu Glu Leu Ala  
                     115                      120



图1

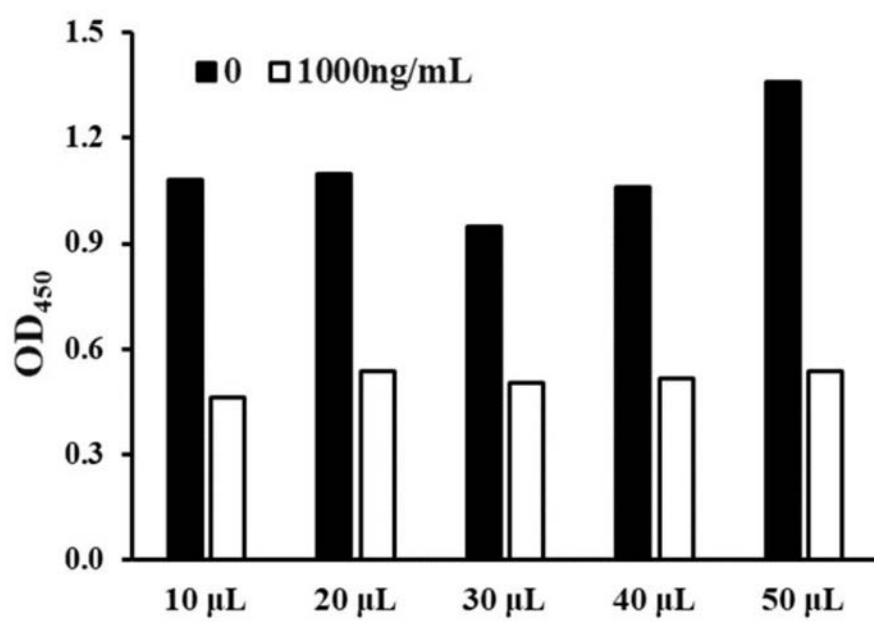


图2

专利名称(译)	纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物及其制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109824784A</a>	公开(公告)日	2019-05-31
申请号	CN201910104627.4	申请日	2019-02-01
[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 吴纱 田杰生		
发明人	许艇 吴纱 田杰生 薛衍乐		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/62 C12N1/21 G01N33/543 G01N33/531 C07C37/68 C07C39/367 C12R1/01		
代理人(译)	王文君 黄爽		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供一种纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物及其制备方法与应用。将纳米抗体-磁小体膜蛋白融合基因插入到自杀质粒的多克隆位点处得到重组质粒，将重组质粒转移至野生型磁螺菌中，获得的重组磁螺菌即可在磁小体膜上展示靶标纳米抗体(免疫磁珠复合物)。所述免疫磁珠复合物同时具有磁性分离和对相应抗原识别的双重功能，不仅可用于目标抗原的ELISA检测及应用，还可以用于目标抗原的吸附和富集。本发明基于基因工程技术制备出纳米抗体-磁小体免疫磁珠复合物，相较传统的化学偶联方法具有生产成本低、周期短、易于纯化等明显优势。

2 × pfu Mix	25 µl
正向引物	0.5 µl
反向引物	0.5 µl
模板	0.5 µl
ddH <sub>2</sub> O	23.5 µl