



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105399826 A

(43) 申请公布日 2016.03.16

(21) 申请号 201510869928.8

(22) 申请日 2015.12.02

(71) 申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府
大道 999 号

(72) 发明人 涂迨 许杨 熊勇华 李燕萍
黄志兵

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有
限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

C07K 16/14(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C07D 493/14(2006.01)

C07D 493/22(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表4页

(54) 发明名称

能特异性结合黄曲霉毒素的单域重链抗体

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,涉及单域重链抗体技术,具体为针对黄曲霉毒素的单域重链抗体,其具有 SEQ ID NO. :1 所示的氨基酸序列。该抗体具有耐酸碱、耐高温以及易于生产等特性,对于黄曲霉毒素的低成本、可重复使用的免疫学检测方法有重要的实用价值。

1. 针对黄曲霉毒素的单域重链抗体,具有 SEQ ID NO. :1 所示的氨基酸序列。
2. 一种核酸分子,其特征是编码权利要求 1 中所述氨基酸序列。
3. 包含权利要求 2 所述的核酸序列的载体。
4. 包含权利要求 3 所述载体的宿主细胞。
5. 权利要求 1 所述的针对黄曲霉毒素的单域重链抗体在免疫检测、黄曲霉毒素富集以及纯化中的应用。
6. 权利要求 1 所述的针对黄曲霉毒素的单域重链抗体在制备黄曲霉毒素免疫检测、富集以及纯化试剂或材料中的应用。
7. 权利要求 1 所述的针对黄曲霉毒素的单域重链抗体通过随机或定点突变技术进行改造所获得的能与黄曲霉毒素特异性结合的抗体。

能特异性结合黄曲霉毒素的单域重链抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及单域重链抗体技术（又称纳米抗体技术），以及基因工程抗体技术，特别是针对黄曲霉毒素的单域重链抗体或多肽。

技术背景

[0002] 黄曲霉毒素 (Aflatoxin) 是由黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*)、集蜂曲霉 (*Aspergillus nomius*) 和溜曲霉 (*Aspergillus tamarii*) 等真菌产生的次级代谢产物，具有强致癌性和强免疫抑制性。黄曲霉毒素是一类化学结构类似的二呋喃香豆素衍生物，主要包括黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)、B₂ (AFB₂)、G₁ (AFG₁)、G₂ (AFG₂) 和 M₁ (AFM₁) 等。在已发现的黄曲霉毒素中，黄曲霉毒素 B₁ 的毒性最强，被世界卫生组织的癌症研究机构划定为 I 类致癌物。产毒真菌菌株广泛存在于自然界中，粮食油料等农产品在生产、加工以及储藏等过程中均可能受到污染，导致黄曲霉毒素超标。我国是黄曲霉毒素污染情况较为严重的地区。因此，开发稳定、快速、高灵敏、高通量的黄曲霉毒素检测方法，对于保障我国食品安全、减少由此带来的损失具有重要意义。

[0003] 现有的黄曲霉毒素检测方法主要有免疫分析法、仪器分析法以及薄层层析法。其中免疫分析法可避免其它两类方法存在的一些缺陷，具有灵敏度高、成本低以及可现场检测等优点。免疫分析法的原理是基于抗原抗体的特异性识别，抗体的性能是免疫分析方法灵敏度、准确度等指标的决定性因素。因此获得针对黄曲霉毒素的抗体是建立相关免疫学检测技术的前提和关键。

[0004] 单域重链抗体（又称纳米抗体）是由羊驼重链抗体的可变区组成，又称为纳米抗体，具有耐酸碱、耐高温以及易于生产等特性。这些特性对于黄曲霉毒素的低成本、可重复使用的免疫学检测方法有重要的实用价值。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供针对黄曲霉毒素的单域重链抗体，可以被用于制备检测黄曲霉毒素的试剂和工具。

[0006] 本发明提供一个针对黄曲霉毒素的单域重链抗体（即本发明能特异性结合黄曲霉毒素的单域重链抗体，下同），具有 SEQ ID NO. :1 所示的氨基酸序列。其氨基酸序列的 IMGT 编号和结构域的划分包括四个框架区 (Framework region, FR) 和三个互补决定区 (Complementarity-determining region, CDR)。

[0007] 本发明提供一个核酸分子，其特征是编码 SEQ ID NO. :1，通过遗传密码子可以随时获得该核酸分子的具体序列。

[0008] 本发明还提供一个核酸分子，其特征是编码 SEQ ID NO. :1 部分结构域，通过遗传密码子可以随时获得该核酸分子的具体序列。可以为 SEQ ID NO. :2 核酸分子。

[0009] 本发明所提供的核苷酸序列或者至少部分序列可以通过合适的表达系统进行表达以得到相应的蛋白质或多肽。这些表达系统包括细菌，酵母菌，丝状真菌，动物细胞，昆虫

细胞,植物细胞,或无细胞表达系统。

[0010] 本发明还提供一种载体,包含所述核酸序列。由于遗传密码子具有简并性,该核酸序列可以根据不同的应用目的而不同。

[0011] 本发明还提供一种宿主细胞,包括所述蛋白质或表达载体。

[0012] 本发明还提供一种检测黄曲霉毒素的方法,含有本发明所述针对黄曲霉毒素的单域重链抗体。基于本发明提供的针对黄曲霉毒素的单域重链抗体与黄曲霉毒素特异性结合的能力,建立黄曲霉毒素的检测方法。其中,优选的方法包括酶连免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),荧光免疫法(Fluoroimmunoassay, FIA),免疫芯片法,亲和层析法和免疫层析法等。

[0013] 本发明所提供的氨基酸序列可以作为前体,通过随机或定点突变技术进行改造,能够获得性质(水溶性、稳定性、亲和力以及特异性等)更好的突变体。

[0014] 本发明还涉及前述针对黄曲霉毒素的单域重链抗体在免疫检测、黄曲霉毒素富集以及纯化中的应用。这些免疫检测指的是非疾病诊断治疗目的的免疫检测。

[0015] 本发明所叙述的一些术语具有如下含义:

[0016] 结构域:蛋白质三级结构的基本结构单位,通常具有一定的功能。

[0017] IMGT 编号:IMGT 数据库(The International ImMunoGeneTics Database)中的一种已经标准化的抗体氨基酸序列编号方法。具体编号方法可以参考文献(Ehrenman, F., Q. Kaas, et. al. (2010). IMGT/3D structure-DB and IMGT/DomainGapAlign:a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. Nucleic Acids Res38(Database issue):D301-307. Lefranc, M. P., C. Pommie, et al. (2003). IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Igsuperfamily V-like domains Dev comp Immunol 27(1):55-77.)中的描述。

[0018] 密码子(codon):又称为三连体密码子(triplet code),指对应于某种氨基酸的核苷酸三联体。在转译过程中决定该种氨基酸插入生长中多肽链的位置。

具体实施方式

[0019] 下面通过单域重链抗体(多肽)的制备、分析及应用,对本发明做进一步说明,这些具体实施例不应以任何方式被解释为限制本发明的应用范围。

[0020] 实施例 1:

[0021] 抗黄曲霉毒素单域重链抗体(即针对黄曲霉毒素的单域重链抗体)免疫文库的构建

[0022] 将黄曲霉毒素 B₁与匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)共价偶联,得到黄曲霉毒素人工抗原 AFB₁-KLH,取 300 μg AFB₁-KLH 与弗氏完全佐剂乳化后,对羊驼(Lama pacos)进行皮下多点注射免疫。加强免疫采用 150 μg AFB₁-KLH 与弗氏不完全佐剂乳化,间隔 2 周进行,每次免疫 7 天后静脉取血,采用间接 ELISA 法测定血清效价,选择血清效价最高的样品分离淋巴细胞,提取 RNA。

[0023] RNA 的提取参照 TAKARA 公司 RNAiso 试剂说明书进行。以 RNA 为模板,oligo dT 为引物,参照 TAKARA 公司反转录酶说明书合成 cDNA 第一链。

[0024] 采用 PrimeSTAR 高保真 DNA 聚合酶,经巢式 PCR 获得重链抗体的可变区编码基因(采用的引物见表 1)。第一轮 PCR 分别以引物 AlpVh-LD 和 CH2-R 扩增 cDNA,反应条件为,98℃,10s,55℃,20s,72℃,1min,20 个循环,98℃,10s,68℃,1min,72℃延伸 10min。

[0025] 将第一轮 PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,回收 600bp ~ 750bp 的 DNA 片段,作为第二轮 PCR 的模板,分别用引物 AlpVh-SfiI 和 AlpVHHR1-NotI, AlpVh-SfiI 和 AlpVHHR2-NotI,进行扩增,反应条件为,98℃,10s,50℃,20s,72℃,40s,5 个循环,98℃,10s,68℃,40s,30 个循环,72℃延伸 10min。经 DNA 片段回收试剂盒回收、定量,于 -20℃ 保存备用。将噬菌粒 pHEN1 和 PCR 扩增产物分别用 Sfi I、Not I 双酶切,经琼脂糖凝胶回收、定量后,以 1 : 3 摩尔比,在 16℃,过夜连接。

[0026] 表 1 文库构建及鉴定所用的引物

[0027]

引物名称	序列
AlpVh-LD	5'-CTTGGTGGTCCTGGCTGC-3'
AlpVh-SfiI	5'- <u>tcgcccggccggccatggcc</u> CAGKTGCAGCTCGTGGAGTCNNGGNGG-3'
AlpVHHR1-NotI	5'-cgagt <u>ggcggcgc</u> GGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3'
AlpVHHR2-NotI	5'-cgagt <u>ggcggcgc</u> TTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG-3'
CH ₂ -R	5'-GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC-3'
M13-R	5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'
pHEN-R	5'-GCCCATTCAGATCCTCTTC-3'

[0028] 注:下划线表示限制性内切酶识别序列

[0029] 连接产物经乙醇沉淀后,溶于 10 μL 无菌水,分十次进行电穿孔转化大肠杆菌 TG1。取 10 μL 电击、培养后的菌液倍比稀释,涂布氨苄青霉素 2×YT 培养板,计算库容。其余部分全部涂布于 24cm×24cm 氨苄青霉素 2×YT 培养板,37℃,倒置培养 12 ~ 16h。用 10mL,2×YT 培养基将培养板上的菌苔刮洗后,加入终浓度 15 ~ 30% 甘油,分装,-80℃ 保存备用。

[0030] 根据计算的库容量结果,接种 10 倍库容量的活细胞于 20mL 的 2×YT(含 2% 葡萄糖,100 μg/mL 氨苄青霉素),30℃,220r/min 培养至 OD600 达 0.5,按感染复数 20 : 1 加入辅助噬菌体,37℃,220r/min,60min。将培养物离心,用 50mL 的 2×YT(含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 50 μg/mL 卡那霉素)重悬沉淀,30℃,220r/min 过夜培养后,3000g 离心取上清,加入 5×PEG/NaCl 溶液,冰上放置 1h 或 4℃ 过夜,12000rpm 离心 30min,重悬沉淀于含 10% 甘油的磷酸缓冲液(PBS,0.01M, pH 7.4),即得到抗黄曲霉毒素单域重链抗体免疫文库,取 10 μL 测定滴度,其余分装于 -80℃ 保存备用。

[0031] 实施例 2 :

[0032] 抗黄曲霉毒素单域重链抗体的淘选与鉴定

[0033] 采用固相亲和淘选的方法从实施例 1 所得抗黄曲霉毒素单域重链抗体免疫文库中淘选针对黄曲霉毒素的单域重链抗体。将 AFB₁与卵清白蛋白(albumin, OVA)共价偶联,得到人工抗原 AFB₁-OVA。每孔加入 100 μL 用 PBS 稀释的人工抗原 AFB₁-OVA,4℃,包被过夜,每轮淘选的包被浓度分别为 100,75,50 μg/mL;吸出包被液,PBS 洗板 3 次,每孔加入 300 μL 3% BSA-PBS,37℃,封闭 2h;PBS 洗板 6 次,加入 100 μL 噬菌体抗体文库(约含 2×10¹¹CFU),37℃,孵育 1.5h;吸出未结合的噬菌体,用 PBST(含 0.5% Tween-20)洗板 5 次(逐轮增加 5 次),再用 PBS 洗板 10 次(洗板次数逐轮增加 5 次);以 100 μL 洗脱液(甘氨酸-盐酸, pH2.2)洗脱吸附在酶标孔中的噬菌体,用 50 μL Tris-HCl(1mol/L, pH 8.0)中

和洗脱物,取 10 μ L 用于滴度测定,其余洗脱物扩增后用于下一轮淘选。第二轮和第三轮淘选采用竞争洗脱,分别用 50 和 25ng/mL 的 AFB₁溶液在 37°C,孵育 1h。

[0034] 经三轮淘选后,采用辅助噬菌体 KM13 对随机挑取的单克隆进行救援,分别得到展示抗体可变区的噬菌体颗粒,再用间接 phage-ELISA 和间接竞争 phage-ELISA 测定噬菌体颗粒的结合活性和特异性,实验设定阴性对照及背景对照,具体加样步骤见表 2。

[0035] 表 2 间接 phage-ELISA 加样表

[0036]

	实验组	加标竞争	背景对照	空白对照 a
包被	AFB ₁ -OVA	AFB ₁ -OVA	OVA	AFB ₁ -OVA
封闭	1×Blocking buffer (3%脱脂牛奶 W/V)			
结合	噬菌体	噬菌体+ 黄曲霉毒素标准品	噬菌体	PBS
二抗	HRP/anti-M13			

[0037] 将 ELISA 阳性克隆送生物技术服务公司进行序列测定,得到插入片段的 DNA 序列,其编码针对黄曲霉毒素的单域重链抗体,具体如下 (SEQ ID NO. :2) :

[0038] CAGTTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGGAAGCATCTATAGCCTCGTTGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGAGTGGGTGCGAGATATTACTCGTGTGGTAACACAAACCATGCGAACTCCAGGGAGGACCGATTACCATCTCGACAGGTGTCCCCTGGAACACGGTGATTCTGTCTATGAACAGCCTGGAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGTAATGCCCGAGTTACTCCGGGCTTAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA。

[0039] 依据 DNA 测序结果及密码子表可获得针对黄曲霉毒素的单域重链抗体的氨基酸序列 (SEQ ID NO. :1) :

[0040] QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSIYSLVAMGWYRQAPGKQREWVADITRVGNTNHANSREDRFTI
STGVPWNTVILSMNSLEPEDTAVYYCNARVTSGLNYWGQGTQVTVSS

[0041] 采用间接竞争 phage-ELISA 法对阳性克隆与几种不同黄曲霉毒素亚型的交叉反应率进行测定,将 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂和 AFM₁五种标准品稀释至 12 个不同的工作浓度,在同样的条件下进行间接竞争 phage-ELISA 测定,分别绘制竞争 ELISA 曲线,计算抑制率为 50%时的标准品浓度 (IC₅₀),按照公式:交叉反应率 (%) = (AFB₁IC₅₀/类似物 IC₅₀) × 100%,所述类似物为 AFB₂、AFG₁、AFG₂或 AFM₁,得到本发明阳性克隆 (针对黄曲霉毒素的单域重链抗体) 对于 AFB₁的 50%抑制浓度。结果表明,本发明阳性克隆 (针对黄曲霉毒素的单域重链抗体) 对于 AFB₁具有较好的特异性,对 AFG₁和 AFG₂也有一定的结合能力。

[0042] 实施例 3 :

[0043] 抗黄曲霉毒素单域重链抗体的规模制备

[0044] 编码抗 AFB₁单域重链抗体的 DNA 片段的获取 :1. 采用限制性内切酶 SfiI/NotI, 双酶切噬菌粒 pHEN- 抗 AFB₁单域重链抗体基因,琼脂糖凝胶电泳回收抗 AFB₁单域重链抗体基因 ;2. 直接将抗 AFB₁单域重链抗体编码序列送生物技术服务公司进行化学合成 ;3. 设计

特异性引物,通过 PCR 技术从羊驼 (*Lama pacos*) 来源的 cDNA 库中扩增。

[0045] 将得到的抗 AFB₁单域重链抗体基因片段克隆至表达载体 pET25,经 PCR 和酶切鉴定,构建完成抗 AFB₁单域重链抗体的大肠杆菌表达质粒。

[0046] 将表达质粒转化至大肠杆菌 BL21,挑取单菌落进行诱导表达。将单菌落接入 4mL LBA(Luria-Bertani broth with 100 μg/mL ampicillin) 液体培养基中,37℃、250r/min 振荡培养 12h;以 1%培养基体积的接种量将其转接到 50mL LBA 液体培养基中,37℃、250r/min 振荡培养至 OD₆₀₀达到 0.5(约需 2.5~3h),加入终浓度 0.1mM 的 IPTG,30℃、200r/min 诱导培养。

[0047] 诱导培养物 8000r/min 离心,在细胞沉淀中加入 20mL 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 混匀,8000r/min 离心,去上清,保留细胞沉淀;在细胞沉淀中加入 10mL 相同缓冲液,混匀,冰上超声波细胞破碎处理,超声破碎条件为 200W,破碎 2s,间歇 3s,共 240 个循环,在 4℃下对细胞破碎物 12000r/min 离心 20min,取上清进行亲和层析纯化和 SDS-PAGE 电泳分析,或在上清中加入终浓度 30%的甘油,混匀,保存于 -20℃冰柜待用。

[0048] 通过优化诱导表达条件(如宿主菌、表达载体、诱导培养时间、温度以及 IPTG 浓度等),可以进一步提高目的蛋白(单域重链抗体)表达量,为大量制备抗 AFB₁单域重链抗体提供了途径。

[0049] 实施例 4:

[0050] 抗黄曲霉毒素单域重链抗体的融合表达

[0051] 将本发明抗 AFB₁单域重链抗体基因克隆至融合表达载体 pAP,经 PCR 和酶切鉴定,构建完成抗 AFB₁单域重链抗体的碱性磷酸酶融合表达质粒。

[0052] 碱性磷酸酶可以非特异性催化磷酸单酯水解生成无机磷酸和相应的醇、酚或糖类化合物。该酶常作为信号标签用于 ELISA、免疫印迹、组织化学等检测方法。融合表达质粒将抗 AFB₁单域重链抗体融合于碱性磷酸酶的 N 端,参考应用实例 2 中的表达方法,可以在大肠杆菌中表达、纯化出融合蛋白 AP-抗 AFB₁单域重链抗体基因。

[0053] 实施例 5:

[0054] 抗黄曲霉毒素单域重链抗体用于黄曲霉毒素 B₁的检测

[0055] 样品准备:称取不含黄曲霉毒素的花生、玉米样品各三份,分别加入 AFB₁标准品 10 μg/kg,50 μg/kg,100 μg/kg,用 25mL 60%的甲醇-PBS 溶液涡旋振荡 15min,9000g 离心 10min,上清经 PBS 稀释后待用。

[0056] 间接竞争酶联免疫检测:

[0057] 用 PBS(0.01M, pH 7.4) 将 AFB₁人工抗原稀释至 0.25 μg/mL,100 μL/孔,包被于酶标板,4℃过夜,含 0.5% Tween-20(V/V) 的磷酸缓冲液 (PBST) 洗板 5 次,拍干板条,加入 3%脱脂牛奶 (W/V),300 μL/孔,37℃封闭 2h。PBST 洗板 3 次后,每孔加入 50 μL 加入本发明针对 AFB₁单域重链抗体和 50 μL AFB₁标准品溶液或待测样品,水平方向轻轻混匀,37℃温育 1h。PBST 洗板 5 次,拍干,加入辣根过氧化物酶标记的兔抗 His Tag 标签抗体,100 μL/孔,37℃温育 1h。PBST 洗板 5 次,拍干,加入 100 μL/孔 TMB 显色液,37℃避光显色 5min。加入 50 μL/孔终止液 (2M H₂SO₄),酶标仪读数。根据测定的吸光值计算样品中 AFB₁的含量。

100	105	110	
Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 2			
<211> 348			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<400> 2			
cagttgcagc tegtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc		60	
tctgttacag cctetggaag catctatagc ctcttgcca tgggctgcta ccgccaggct		120	
ccaggggaagc agcgcgagtg ggtcgcagat attactcgtg ttgtaaacac aaaccatgcg		180	
aaectcaggg aggaccgatt caccatctcg acaggtgtcc cctggaacac ggtgattctg		240	
tctatgaaca gcctggaacc tgaggacacg gccgtctatt attgtaatgc cegagttacc		300	
tccgggetta actactgggg ccaggggacc caggtcaccg tctctca		348	
<210> 3			
<211> 18			
<212> DNA			
<213> 人工引物			
<400> 3			
ctfggtggtc ctggctgc		18	
<210> 4			
<211> 49			
<212> DNA			
<213> 人工引物			
<220>			
<221> misc feature			
<222> (44)..(44)			

[0003]

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (47)..(47)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 4

tcgcggecca gccggccatg gccagktgc agctcgtgga gtcngngg 49

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 5

cgagtgcggc cgcgggtct tcgctgtgtg ggc 33

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 6

cgagtgcggc cgcttgtgtg ttgtgtct tggg 34

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 7

ggtacgtgct gttgaactgt tcc 23

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 8

[0004]

agcggataac aattcacac agga 24

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 9

gcccattca gatectcttc 20

专利名称(译)	能特异性结合黄曲霉毒素的单域重链抗体		
公开(公告)号	CN105399826A	公开(公告)日	2016-03-16
申请号	CN201510869928.8	申请日	2015-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	涂追 许杨 熊勇华 李燕萍 黄志兵		
发明人	涂追 许杨 熊勇华 李燕萍 黄志兵		
IPC分类号	C07K16/14 C12N15/13 G01N33/53 C07D493/14 C07D493/22		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，涉及单域重链抗体技术，具体为针对黄曲霉毒素的单域重链抗体，其具有SEQ ID NO. : 1所示的氨基酸序列。该抗体具有耐酸碱、耐高温以及易于生产等特性，对于黄曲霉毒素的低成本、可重复使用的免疫学检测方法有重要的实用价值。

引物名称	序列
AlpVh-LD	5'-CTTGGTGGTCCTGGCTGC-3'
AlpVh-SfiI	5'-tcggggcccaagccatgcccCAGKTGCAGCTCGTGGAGTCNGGNGG-3'
AlpVHHR1-NotI	5'-cgagtcgcccgcGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3'
AlpVHHR2-NotI	5'-cgagtcgcccgcTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG-3'
CH ₂ -R	5'-GGTACGTGCTGTTGAACTGTTC-3'
M13-R	5'-AGCGGATAACAATTCACACAGGA-3'
pHEN-R	5'-GCCCCATTGATCCTCTTC-3'