



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102453093 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 30

(21) 申请号 201010527116. 2

(22) 申请日 2010. 10. 28

(73) 专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街  
1 号

(72) 发明人 廖玉才 李和平 胡祖权 张静柏

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

C07K 16/14 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101738479 A, 2010. 06. 16, 全文.

CN 1618974 A, 2005. 05. 25, 全文.

Lauer B. Production of a Single-Chain  
Variable Fragment Antibody against  
Fumonisin B1. 《J Agric Food Chem》. 2005, 第  
53 卷第 899-904 页.

Zhou HR 等. Molecular cloning and  
expression of recombinant phage antibody  
against fumonisin B1. 《Journal of Food  
Protection》. 1996, 第 59 卷 (第 11 期), 第  
1208-1212 页.

审查员 王金凤

权利要求书1页 说明书12页  
序列表6页 附图3页

(54) 发明名称

抗伏马菌素单链抗体的筛选及应用

(57) 摘要

本发明属于基因工程技术领域, 具体涉及  
一种抗伏马菌素单链抗体的筛选及其在伏马菌  
素免疫学检测方面的应用。直接从偶联的抗原  
FB1-KLH 免疫的小鼠脾脏细胞出发, 利用分子克  
隆方法和技术构建单链抗体基因文库, 再通过噬  
菌体展示技术筛选、表达 ELISA 鉴定及序列测定,  
最后获得一个高亲和力的抗伏马菌素单链抗体及  
其编码基因, 命名为 FB-Mu 1H3。该单链抗体在大  
肠杆菌中进行大量表达纯化后可直接应用于伏马  
菌素的检测, 包括在检测田间作物、饲料、粮食或  
食品伏马菌素污染中的应用。

1. 一种抗伏马菌素单链抗体,其特征在于,所述的抗伏马菌素单链抗体的编码核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO :1 所示,其氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO :2 所示,还具有下列特征:

所述的抗伏马菌素单链抗体主要由抗体重链可变区  $V_H$ , 抗体轻链可变区  $V_L$  和连接肽组成,所述的抗体重链可变区  $V_H$  和抗体轻链可变区  $V_L$  通过连接肽  $(Gly_4Ser)_3$  连接共同完成伏马菌素的识别和结合,

其中:

所述的抗体重链可变区  $V_H$  由 363 个核苷酸编码,其核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO :3 所示;

所述的抗体重链可变区  $V_H$  由 121 个氨基酸组成,其氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO :4 所示;

所述的抗体轻链可变区  $V_L$  由 327 个核苷酸编码,其核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO :5 所示;

所述的抗体轻链可变区  $V_L$  由 109 个氨基酸组成,其氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO :6 所示。

2. 权利要求 1 所述的抗伏马菌素单链抗体在制备伏马菌素 ELISA 检测试剂盒中的应用。

## 抗伏马菌素单链抗体的筛选及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种抗伏马菌素单链抗体的筛选及应用,与抗体筛选技术有关。

### 背景技术

[0002] 伏马菌素 (Fumonisin) 是上世纪 80 年代末发现的一种由串珠镰刀菌 (*Fusarium verticillioides*) 和多育镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*) 等真菌产生的水溶性霉菌毒素,是一类由不同多氢醇和丙三羧酸组成结构类似的双酯化合物。1988 年 Gelderblom 首次从串珠镰刀菌培养液中分离出伏马菌素。随后,Laurenf 等在 1989 年又从伏马菌素中分离出伏马菌素 B1 (FB1) 和伏马菌素 B2 (FB2)。伏马菌素是一组相关的极性代谢产物,到目前为止,已发现的伏马菌素有 11 种,分为 A、B、C、P 组,其中 B 组分布最广,毒性最强。

[0003] 伏马菌素 B1 (英文简称:FB1,下同) 的产生菌串珠镰刀菌 (*Fusarium verticillioides*) 和多育镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*) 等真菌为非专性、非宿主特异性的病原菌,能够污染玉米、高粱、小麦、水稻和豆类等粮食作物及某些饲料,因而伏马菌素的污染广泛存在于粮食作物的籽粒或饲料中。研究表明,伏马菌素能够引起多种动物疾病,如马脑白质软化症和猪肺水肿等。在大鼠、兔和羔羊等许多动物的急性实验中发现,伏马菌素具有肝毒性和肾毒性。伏马菌素的分子结构类似于动物体内的神经鞘氨醇 (sphingosine, So) 和二氢神经鞘氨醇 (sphinganine, Sa) 等神经鞘脂类物质,可通过抑制神经鞘脂类的生物合成,导致动物组织、血、尿中二氢神经鞘氨醇 / 神经鞘氨醇 (Sa/So) 比值升高,促进细胞凋亡、干扰细胞生长和分化,具有明显的细胞毒性。伏马菌素还具有生殖毒性、胚胎毒性、免疫毒性和大鼠致癌性。因而伏马菌素的研究得到国际社会的广泛关注,成为继黄曲霉毒素 (Aflatoxin) 之后新的研究热点。调查发现,FB1 还可能是人类食管癌高发的诱因,在我国和南非部分食管癌高发地区玉米的 FB1 含量都高于低发区,国际癌症研究机构 (International Agency of Research Cancer, IARC) 将伏马菌素 B1 列为 2B 类,即可疑人类致癌物。另外,伏马菌素不能在动物体内分解成无毒的物质,能够通过鸡蛋、牛奶和动物组织等食物在人体内积累。因此,粮食和饲料作物中污染的伏马菌素严重威胁着食品安全及人畜健康,美国、欧盟等许多国家已经制定了伏马菌素在食品和饲料及其制品中的限量标准。

[0004] 鉴于 FB1 对食品安全的危害性,测定和调查其在玉米等粮食及其制品中的含量,并对 FB1 污染进行风险性评估,规定食品和饲料中的限量标准,以保障人类的健康显得尤为重要。目前,伏马菌素的检测分析方法包括薄层色谱法 (TLC)、气相色谱法 (GC)、高效液相色谱法 (HPLC)、气质谱联用法 (GC-MS)、液-质谱联用法 (LC-MS) 和毛细管电泳法等,这些方法虽具有较高的灵敏度和特异性,但需繁杂的提纯净化步骤和较贵重的仪器设备,不易推广使用。而应用 ELISA 等免疫学检测方法,则具备简单、快速、灵敏的特点,可同时检测大量样品,因而受到各国学者的重视。目前,国外报道的用于伏马菌素免疫检测的抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体和单链抗体,而国内报道的都是通过杂交瘤融合细胞

筛选得到的单克隆抗体。多克隆和单克隆抗体的制备都需要涉及动物,而且多克隆抗体的特异性较差,单克隆抗体筛选需要专门的细胞培养设备,细胞保存需要专门的超低温保存设备,生产过程耗时费力,成本高。国外报道的有两篇关于抗伏马菌素单链抗体的制备的文献,Zhou 等(1996)分别通过噬菌体展示筛选免疫抗体基因文库和杂交瘤细胞转化获得单链抗体(Zhou, H. R. ;Pestka, J. J. ;Hart, L. P. Molecular cloning and expression of recombinant phage antibody against fumonisin B1. J. Food Prot. 1996, 59, 1208-1212. ),但其免疫小鼠和筛选抗体所用抗原为偶联的 FB1-BSA 和 FB1-0A,与本发明所用抗原不相同,抗体筛选方法和过程差别较大,且文章中说明得到的单链抗体亲和力较低,需要进一步改善其亲和力后才能够用于伏马菌素检测 ;Lauer 等(2005)通过噬菌体展示筛选抗体基因文库得到抗 FB1 的单链抗体可用于伏马菌素检测(Lauer, B. ;Ottleben, I. ;Jacobsen, H, J. ;Reinard, T. Production of a single-chain variable fragment antibody against fumonisin B1. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 899-904. ),但其抗体基因来源为人工合成的抗体基因文库,完全不同于本发明构建的免疫抗体基因文库。更重要的是,这两篇国外报道的文献虽获得了抗伏马菌素的单链抗体,但并未公布其核苷酸或氨基酸序列,而且国内市场上也未有相关检测产品出售。因此,本发明通过构建免疫抗体基因文库,利用噬菌体抗体库技术筛选获得抗伏马菌素单链抗体,可为检测和调查粮食作物及其制品中伏马菌素的污染情况提供可靠有效的检测手段。

## 发明内容

[0005] 本发明目的在于克服现有检测技术存在的缺陷和不足,利用噬菌体抗体库技术获得一种抗伏马菌素单链抗体,用于镰刀菌菌株本身产生的毒素以及粮食、饲料或食品中伏马菌素污染的免疫检测,为保障食品安全提供可靠有效的检测手段。

[0006] 本发明是这样实现的:直接从偶联的抗原 FB1-KLH 免疫的小鼠脾脏细胞出发,利用分子克隆方法和技术构建单链抗体基因文库,再通过噬菌体展示技术筛选、表达 ELISA 鉴定及序列测定,最后获得一个高亲和力的抗伏马菌素单链抗体及其编码基因,申请人将其命名为 FB-Mu 1H3,该单链抗体基因可在大肠杆菌中进行可溶性表达。

[0007] 本发明的抗伏马菌素单链抗体由 819 个核苷酸组成,其核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO :1 所示。

[0008] 本发明的抗伏马菌素单链抗体由 272 个氨基酸组成,其氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO :2 所示。

[0009] 本发明的抗伏马菌素单链抗体主要由抗体重链可变区  $V_H$ 、抗体轻链可变区  $V_L$  和连接肽组成,抗体重链可变区  $V_H$  和抗体轻链可变区  $V_L$  通过连接肽  $(Gly_4 Ser)_3$  连接共同完成伏马菌素的识别和结合。

[0010] 本发明的抗伏马菌素单链抗体的重链可变区  $V_H$  由 363 个核苷酸组成,其核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO :3 所示。

[0011] 本发明的抗伏马菌素单链抗体的重链可变区  $V_H$  由 121 个氨基酸组成,其氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO :4 所示。

[0012] 本发明的抗伏马菌素单链抗体的抗体轻链可变区  $V_L$  由 327 个核苷酸组成,其核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO :5 所示。

[0013] 本发明的抗伏马菌素单链抗体的抗体轻链可变区  $V_L$  由 109 个氨基酸组成,其氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO :6 所示。

[0014] 本发明的抗伏马菌素单链抗体在大肠杆菌中进行大量表达纯化后可直接应用于伏马菌素的检测,所述的应用包括在检测田间作物、饲料、粮食或食品伏马菌素污染中的应用,也可以作为在制备 ELISA 检测试剂盒中的应用。

[0015] 本发明的有益效果:

[0016] 1、本发明的有益效果之一是利用噬菌体抗体库技术,构建了抗伏马菌素单链抗体基因文库,通过噬菌体展示技术筛选获得一个高亲和力的抗伏马菌素单链抗体及其编码基因。

[0017] 2、本发明的有益效果之二是提供的单链抗体可用于在粮食作物的籽粒、饲料或食品中的因潜在的伏马菌素污染的生物材料或产品的快速检测。本发明所提供的抗伏马菌素单链抗体通过重组大肠杆菌表达纯化后可直接用于伏马菌素的检测。

[0018] 3、本发明的有益效果之三是提供的单链抗体生产成本低。目前国内的报道主要集中于单克隆抗体的制备,但这需要使用动物和专门的细胞培养设备,细胞保存需要专门的超低温保存设备,生产过程费用昂贵、耗时耗力。而本发明所提供的抗伏马菌素单链抗体可在重组大肠杆菌中进行大量可溶性表达,不需要贵重的仪器和繁琐的操作,成本低,适合大规模的生产。

[0019] 4、本发明的有益效果之四是提供的单链抗体基因易于通过基因工程操作,如碱基突变等改变基因特性,提高单链抗体的稳定性或亲和力。

#### 附图说明

[0020] SEQ ID NO :1 是本发明的抗伏马菌素单链抗体的核苷酸序列,序列全长为 819bp。

[0021] SEQ ID NO :2 是本发明的抗伏马菌素单链抗体的氨基酸序列,由 272 个氨基酸组成。

[0022] SEQ ID NO :3 是本发明的抗伏马菌素单链抗体重链可变区  $V_H$  的核苷酸序列,序列全长为 363bp。

[0023] SEQ ID NO :4 是本发明的抗伏马菌素单链抗体重链可变区  $V_H$  的氨基酸序列,由 121 个氨基酸组成。

[0024] SEQ ID NO :5 是本发明的抗伏马菌素单链抗体轻链可变区  $V_L$  的核苷酸序列,序列全长为 327bp。

[0025] SEQ ID NO :6 是本发明的抗伏马菌素单链抗体轻链可变区  $V_L$  的氨基酸序列,由 109 个氨基酸组成。

[0026] 图 1 :是本发明的技术流程图。

[0027] 图 2 :是本发明  $V_H$  和  $V_L$  片段 PCR 扩增产物凝胶电泳图。

[0028] 图中 :M :DNA 分子量标准 ; $V_{H1}$  :IgG1 型重链可变区片段 ; $V_{H2}$  :IgG2a/2b 型重链可变区片段 ; $V_K$  : $\kappa$  链 (轻链) 可变区片段 ; $V_\lambda$  : $\lambda$  链 (轻链) 可变区片段 ;CK :水对照。

[0029] 图 3 :是本发明 scFv 片段 PCR 扩增产物凝胶电泳图。

[0030] 图中 :M :DNA 分子量标准 ;scFv :单链抗体片段。

[0031] 图 4 :是本发明载体 pHENHi 结构图。

[0032] 图 5 :是本发明检测抗体基因文库阳性克隆率提取的质粒 DNA 凝胶电泳图。

[0033] 图中 :M :DNA 分子量标准 ;泳道 1 ~ 20 :20 个单克隆菌编号。

[0034] 图 6 :是本发明检测抗体基因文库阳性克隆率 PCR 扩增产物凝胶电泳图。

[0035] 图中 :M :DNA 分子量标准 ;泳道 1 ~ 20 :20 个单克隆菌编号 ;PK :阳性对照 ;NK :阴性对照。

[0036] 图 7 :是本发明检测抗体基因文库多样性 BstN I 限制性内切酶酶切产物凝胶电泳图。

[0037] 图中 :M :DNA 分子量标准 ;泳道 1 ~ 20 :20 个单克隆菌编号 ;PK :阳性对照 ;NK :阴性对照。

[0038] 图 8 :是本发明纯化的 FB-Mu 1H3 单链抗体 SDS-PAGE 电泳检测图。

[0039] 图中 :M :蛋白分子量标准 ;泳道 1 ~ 3 :缓冲液 B1、B2 和 B3 洗脱液 (杂蛋白) ;泳道 4 ~ 6 :缓冲液 C1、C2 和 C3 洗脱液 (目的蛋白)。

[0040] 图 9 :是本发明纯化的 FB-Mu 1H3 单链抗体 Western blot 分析图。

[0041] 图中 :M :蛋白分子量标准 ;泳道 1 ~ 2 :纯化的 FB-Mu 1H3 单链抗体。

## 具体实施方式

[0042] 实施例 1 :抗原制备

[0043] 采用戊二醛一步偶联法 (Azcona-Olivera, J. I. ;Abouzied, M. M. ;Plattner, R. D. ;Norred, W. P. ;Pestka, J. J. Generation of antibodies reactive with fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub> by using cholera toxin as the carrier-adjuvant. Appl. Environ. Microbiol. 1992, 58, 169-173.) 将伏马菌素 FB1 (购自 Sigma 公司) 与钥孔噉蓝蛋白 (KLH, 购自 Sigma 公司) 偶联 (KLH-NH<sub>2</sub>+OHC-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHO+FB1-NH<sub>2</sub> → KLH-N = HC-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH = N-FB1) 后作为免疫抗原 (FB1-KLH), 将伏马菌素 FB1 与小牛血清白蛋白 (BSA, 购自 Sigma 公司) 偶联 (BSA-NH<sub>2</sub>+OHC-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHO+FB1-NH<sub>2</sub> → BSA-N = HC-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH = N-FB1) 后作为筛选抗原 (FB1-BSA)。

[0044] 实施例 2 :动物免疫

[0045] 用制备的抗原 FB1-KLH 免疫两只 BALB/c 小鼠 (中国科学院武汉病毒研究所实验动物中心) 4 次, 每次间隔 10 天。第一次取 250 μl 免疫抗原与等体积弗氏完全佐剂混合后免疫, 后三次取 250 μl 免疫抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合后免疫。第三次免疫后第 5 天取血清从 1 : 10<sup>3</sup> 倍比稀释至 1 : 128 × 10<sup>3</sup>, 参照林巧爱、董海艳主编, 《医学免疫学与微生物学实验指导》, 浙江大学出版社, 2006 年出版介绍的间接 ELISA 法检测免疫小鼠血清中抗体的水平。检测结果显示被免疫后的小鼠血清中都产生了较高的抗体滴度 (稀释度 > 1 : 10<sup>5</sup>)。

[0046] 实施例 3 :免疫小鼠脾脏 RNA 提取、mRNA 纯化及 cDNA 第一链合成

[0047] 1) 对产生了较高抗体滴度的免疫小鼠再加强免疫一次, 7 天后取免疫小鼠的脾脏。

[0048] 2) 利用 TRNzo1-A<sup>+</sup> 总 RNA 提取试剂 (购自天根生化科技 (北京) 有限公司产品, 按照该试剂的说明书操作) 提取脾脏总 RNA。

[0049] 3) 用 mRNA 纯化试剂盒 (购自 QIAGEN 公司, 按该试剂盒的说明书操作) 对步骤 2)

提取的总 RNA 进行纯化。

[0050] 4) 用 SuperScript™ III 反转录酶 (购自 Invitrogen 公司, 按照该酶的说明书操作) 反转录步骤 3) 得到的纯化 mRNA, 分别合成抗体重链 (IgG<sub>1</sub> 和 IgG<sub>2a/2b</sub>) 和轻链 (κ 链和 λ 链) 的可变区 cDNA 第一链。其中用表 1 所述的引物 Primer 1 反转录合成 IgG<sub>1</sub> 的可变区 cDNA 第一链, 用表 1 所述的引物 Primer 2 反转录合成 IgG<sub>2a/2b</sub> 的可变区 cDNA 第一链, 用表 1 所述的引物 Primer 3 反转录合成 κ 链的可变区 cDNA 第一链, 用表 1 所述的引物 Primer 4 反转录合成 λ 链的可变区 cDNA 第一链。

[0051] 实施例 4: PCR 扩增重链可变区 (V<sub>H</sub>)、轻链可变区 (V<sub>L</sub>) 及单链抗体 (scFv) 基因

[0052] 1) PCR 扩增重链可变区 (V<sub>H</sub>) 和轻链可变区 (V<sub>L</sub>) 基因

[0053] 以实施例 3 反转录合成的 IgG<sub>1</sub> 或 IgG<sub>2a/2b</sub> 的可变区 cDNA 为模板, 利用表 1 所述的正向混合引物 Primer 5 ~ 14 和反向混合引物 Primer 15 ~ 18 分别进行 PCR 扩增, 获得 IgG<sub>1</sub> 和 IgG<sub>2a/2b</sub> 的重链可变区片段 (V<sub>H</sub>); 以实施例 3 反转录合成的 κ 链可变区 cDNA 为模板, 用表 1 所述的正向混合引物 Primer 19 ~ 23 和反向混合引物 Primer 25 ~ 27 进行 PCR 扩增, 获得 κ 链可变区片段 (V<sub>κ</sub>); 以实施例 3 反转录合成的 λ 链可变区 cDNA 为模板, 用表 1 所述的正向引物 Primer 24 和反向引物 Primer 28 进行 PCR 扩增, 获得 λ 链可变区片段 (V<sub>λ</sub>)。在 50 μl PCR 反应液中, 含有 4 μl cDNA, 5 μl PCR 缓冲液 (含 Mg<sup>2+</sup>), 8 μl 1.25mM dNTPs, 2 μl 正向 (混合) 引物 (10 μM), 2 μl 反向 (混合) 引物 (10 μM), 2.5U Taq 聚合酶。PCR 反应条件为: 95°C 5min; 94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 80sec, 30 个循环; 最后 72°C 10min。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 其结果如图 2 所示, V<sub>H</sub> (V<sub>H1</sub> 和 V<sub>H2</sub>) 和 V<sub>L</sub> (V<sub>κ</sub> 和 V<sub>λ</sub>) 片段大小与预期相一致。

[0054] 2) 用 DNA 凝胶回收试剂盒 (购自 QIAGEN 公司, 按照该试剂盒的说明书操作) 分别纯化步骤 1) 扩增得到的 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 片段。

[0055] 3) SOE-PCR 扩增单链抗体 (scFv) 基因

[0056] 加入近等摩尔的 V<sub>H</sub> (IgG<sub>1</sub> 和 IgG<sub>2a/2b</sub> 按摩尔比 50 : 50 混合) 和 V<sub>L</sub> (V<sub>κ</sub> 和 V<sub>λ</sub> 按摩尔比 95 : 5 混合) 片段作为模板, 用表 1 所述的正向混合引物 Primer 5 ~ 14 和反向混合引物 Primer 25 ~ 28 进行 SOE-PCR 扩增, 获得 scFv 基因。SOE-PCR 分两步反应完成, 第一步反应在 50 μl PCR 反应液中, 含有 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 片段各 400ng, 5 μl PCR 缓冲液 (含 Mg<sup>2+</sup>), 8 μl 1.25mM dNTPs, 2.5U Taq 聚合酶。PCR 反应条件为: 95°C 5min, 55°C 2min, 72°C 15min, 7 个循环; 第二步反应在 50 μl PCR 反应液中, 含有 10 μl 第一步反应 PCR 产物, 4 μl PCR 缓冲液 (含 Mg<sup>2+</sup>), 8 μl 1.25mM dNTPs, 2 μl 正向混合引物 (10 μM), 2 μl 反向混合引物 (10 μM), 2.5U Taq 聚合酶。PCR 反应条件为: 95°C 5min; 94°C 1min, 55°C 80sec, 72°C 2min, 30 个循环; 最后 72°C 10min。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 其结果如图 3 所示, scFv 片段大小与预期相一致。

[0057] 4) 用 DNA 凝胶回收试剂盒 (购自 QIAGEN 公司, 按照该试剂盒的说明书操作) 纯化回收步骤 3) 获得的 scFv 片段。

[0058] 实施例 5: 载体 pHENHi 及 scFv 片段酶切、连接

[0059] 1) 分别用 Sfi I 和 Not I 限制性内切酶 (购自 NEB 公司, 按照该酶的说明书操作) 双酶切载体 pHENHi (德国弗朗霍夫分子生物与应用生态学研究所赠送) 和实施例 4 得到的 scFv 片段。

[0060] 2) 用 DNA 凝胶回收试剂盒 (购自 QIAGEN 公司, 按照该试剂盒的说明书操作) 纯化步骤 1) 酶切后的 pHENHi 载体和 scFv 片段。

[0061] 3) 用 T4DNA 连接酶 (购自 NEB 公司, 按照该酶的说明书操作) 连接步骤 2) 回收的 pHENHi 载体和 scFv 片段, 得到酶切连接产物 pHENHi-scFv。

[0062] 4) 参照 J. 萨姆布鲁克等 [美], 《分子克隆实验指南》, 科学出版社, 2003 年, 第三版介绍的方法对步骤 3) 得到的酶切连接产物 pHENHi-scFv 进行乙醇沉淀除盐。

[0063] 实施例 6 : 单链抗体基因文库构建

[0064] 1) 大肠杆菌 XL1-Blue MRF' 感受态细胞制备

[0065] 用无菌牙签蘸取  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存的大肠杆菌 XL1-Blue MRF' 株, 在 LB 固体培养基 (成分: 1% (W/V) 胰蛋白胨, 0.5% (W/V) 酵母提取物, 1% (W/V) NaCl, 1.5% (W/V) 琼脂, pH 7.0) 平板上划线, 于  $37^{\circ}\text{C}$  培养箱培养 16h 后, 挑取一单克隆菌落接种到 5ml LB 液体培养基 (成分: 1% (W/V) 胰蛋白胨, 0.5% (W/V) 酵母提取物, 1% (W/V) NaCl, pH 7.0) 中,  $37^{\circ}\text{C}$ , 200r/min 振荡过夜培养 16h。取 1.6ml 菌液加入到 160ml LB 液体培养基中,  $37^{\circ}\text{C}$ , 230r/min 振荡培养至  $\text{OD}_{600}$  达到 0.45 左右时, 取出培养菌的三角瓶置于冰上冷却 30min 后, 将菌液分装于 50ml 离心管中,  $4^{\circ}\text{C}$ , 4000r/min 离心 15min, 弃上清, 然后用 30ml 预冷的 10% (W/V) 甘油洗涤菌体沉淀两次 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 4000r/min 离心 15min 后弃上清)。最后每个离心管中加入 100  $\mu\text{l}$  预冷的 GYT 培养基 (成分: 0.25% (W/V) 胰蛋白胨, 0.125% (W/V) 酵母提取物, 10% (V/V) 甘油) 悬浮菌体, 分装成 100  $\mu\text{l}$ /管, 立即保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱。

[0066] 2) 电转化酶切连接产物

[0067] 将  $-80^{\circ}\text{C}$  保存的大肠杆菌 XL1-Blue MRF' 感受态细胞取出, 置冰上溶化后, 每管感受态细胞 (100  $\mu\text{l}$ ) 中加入 5  $\mu\text{l}$  酶切连接产物 pHENHi-scFv, 小心轻微地混匀后放冰上静置 3min, 然后将感受态细胞转移至冰上预冷的电转化杯 (0.2mm) (购自 BIO-RAD 公司) 中, 用 BIO-RAD 公司的 MicroPulser™ 电转化仪进行电转化 (设置 BacteriaEc2 程序)。转化后立即加入 1ml SOC 培养基 (成分: 2% (W/V) 胰蛋白胨, 0.5% (W/V) 酵母提取物, 0.05% (W/V) NaCl, 20mM 葡萄糖, pH 7.0) 到电转化杯中, 并将菌液转移至离心管中,  $37^{\circ}\text{C}$ , 200r/min 振荡培养 1h 使细菌复苏。

[0068] 3) 电转化感受态细胞涂布平板培养

[0069] 取出复苏后的感受态细胞, 取 100  $\mu\text{l}$  涂布于 LB 固体培养基 (含 1% (W/V) 葡萄糖, 100  $\mu\text{g/ml}$  氨苄青霉素 (Amp)) 平板用于计算单克隆菌落数。其余的菌液通过 6000r/min 离心 1min 后吸取部分上清丢弃, 每管保留约 100 ~ 150  $\mu\text{l}$  上清重悬菌体, 涂布于 LB 固体培养基 (含 1% (W/V) 葡萄糖, 100  $\mu\text{g/ml}$  Amp) 平板。培养基平板放置于  $37^{\circ}\text{C}$  恒温箱过夜培养 12 ~ 16h 至单克隆菌落长出。

[0070] 4) 抗体基因文库收集保存

[0071] 计算电转化感受态细胞涂布平板培养后长出的单克隆菌落数量, 估算抗体基因文库容量。收集 LB 固体培养基平板上长出的菌落, 加入等体积 50% (V/V) 甘油保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱。

[0072] 通过以上步骤操作, 最后构建的抗伏马菌素单链抗体基因文库容量约为  $2 \times 10^6$  cfu。

[0073] 实施例 7 : 单链抗体基因文库鉴定

[0074] 1) 从实施例 6 平板上长出的转化子中随机挑取 20 个单克隆菌落接种到 LB 液体培养基 (含 1% (W/V) 葡萄糖, 100  $\mu$ g/ml Amp) 中, 37 $^{\circ}$ C, 220r/min 振荡过夜培养 16h。

[0075] 2) 参照 J. 萨姆布鲁克等 [美], 《分子克隆实验指南》, 科学出版社, 2003 年, 第三版介绍的煮沸裂解法提取质粒 DNA, 通过 0.8% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测抗体基因文库的阳性率。

[0076] 3) 以步骤 2) 得到的质粒 DNA 为模板, 用表 1 所述的正向引物 Primer 29 和反向引物 Primer 30 进行 PCR 扩增。在 25  $\mu$ l PCR 反应液中, 含有 50ng 质粒 DNA, 2.5  $\mu$ l PCR 缓冲液 (含  $Mg^{2+}$ ), 2  $\mu$ l 1.25mM dNTPs, 1  $\mu$ l 正向引物 (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l 反向引物 (10  $\mu$ M), 1.25U Taq 聚合酶。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 50sec, 48 $^{\circ}$ C 90sec, 72 $^{\circ}$ C 90sec, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物通过 1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测抗体基因文库的阳性率。

[0077] 4) 用 BstN I 限制性内切酶 (购自 NEB 公司, 按照该酶的说明书操作) 酶切步骤 3) 扩增的 PCR 产物, 酶切产物通过 1.5% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测抗体基因文库的多样性。

[0078] 鉴定结果如图 5 ~ 7 所示, 构建的抗体基因文库阳性率 100%, 多样性高于 85%。

[0079] 实施例 8: 噬菌体展示筛选单链抗体基因文库

[0080] 1) 取实施例 6 收集保存的菌液 (抗体基因文库) 800  $\mu$ l 加入到 50ml 2TY 培养基 (成分: 1.6% (W/V) 胰蛋白胨, 1% (W/V) 酵母提取物, 0.5% (W/V) NaCl, pH 7.0) (含 1% (W/V) 葡萄糖, 100  $\mu$ g/ml Amp) 中, 37 $^{\circ}$ C, 230r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.5。

[0081] 2) 取 5ml 菌液于 50ml 离心管中, 加入 0.5  $\mu$ l M13K07 辅助噬菌体 (购自 Amersham Biosciences 公司, 参照 J. 萨姆布鲁克等 [美], 《分子克隆实验指南》, 科学出版社, 2003 年, 第三版介绍的方法制备保存, 其中: 噬菌体的量为大肠杆菌的 20 倍), 混匀后于 37 $^{\circ}$ C 水浴静置 30min。

[0082] 3) 4000r/min 离心 10min, 去上清, 然后重悬于 140ml 2TY 培养基中 (含 100  $\mu$ g/ml Amp, 25  $\mu$ g/ml 卡那霉素 (Kan)), 30 $^{\circ}$ C, 200r/min 振荡过夜培养至少 15h。

[0083] 4) 将过夜培养的菌液分装于 50ml 离心管中, 4 $^{\circ}$ C, 4000r/min 离心 30min。

[0084] 5) 取上清, 加入 1/5 体积的 PEG/NaCl 溶液 (20% (W/V) 聚乙二醇 (PEG) 6000, 2.5M NaCl), 充分混匀后置冰上沉淀 1h。

[0085] 6) 4 $^{\circ}$ C, 8000r/min 离心 30min, 去上清, 将沉淀重悬于 40ml 灭菌水中, 并立即加入 1/5 体积的 PEG/NaCl 溶液, 充分混匀后 4 $^{\circ}$ C 放置 20min。

[0086] 7) 4 $^{\circ}$ C, 4000r/min 离心 30min, 去上清。

[0087] 8) 轻微离心, 去除残留的 PEG/NaCl 溶液。

[0088] 9) 加入 1.6ml 灭菌水重悬沉淀, 并 4 $^{\circ}$ C, 4000r/min 离心 10min, 取上清于 4 $^{\circ}$ C 保存 (取 10  $\mu$ l 采用  $10^{-2}$  ~  $10^{-11}$  梯度稀释来测定滴度)。

[0089] 10) 用抗原 FB1-BSA (20ng/ $\mu$ l) 包被 ELISA 板 (共 20 孔, 每孔 100  $\mu$ l), 37 $^{\circ}$ C 水浴 2h。

[0090] 11) 用磷酸盐缓冲液 (PBS) (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2 ~ 7.4) 洗涤 3 次。

[0091] 12) 每孔加入 150  $\mu$ l 封闭液 (含 3% (W/V) BSA 的 PBS 溶液), 37 $^{\circ}$ C 水浴封闭 2h (用封闭液封闭一空白孔作为阴性对照)。

- [0092] 10) 用 200  $\mu$  l PBS 分别洗涤 3 次, 每次 3min。
- [0093] 11) 每孔中加入 100  $\mu$  l 取步骤 9) 保存的上清 (噬菌体), 37 $^{\circ}$ C 水浴 2h。
- [0094] 12) 用 200  $\mu$  l PBST (含 0.1% (V/V) Tween 20 的 PBS) 和 PBS 分别洗涤 5 次, 每次 3min (第二轮和第三轮淘选时增加洗涤次数至 10 次和 15 次)。
- [0095] 13) 每孔加入 100  $\mu$  l 三乙胺溶液 (100mM), 室温放置 10min。
- [0096] 14) 立即加入 50  $\mu$  l Tris-HCl 溶液 (1M, pH 7.4) 中和, 并转移至 50ml 离心管中。
- [0097] 15) 取 6ml 在 37 $^{\circ}$ C, 230r/min 振荡培养条件下生长到 OD<sub>600</sub> 为 0.5 ~ 0.9 的大肠杆菌 XL1-Blue MRF' 加入到 50ml 离心管中, 37 $^{\circ}$ C 水浴侵染 30min。
- [0098] 16) 4000r/min 离心 10min, 去上清。
- [0099] 17) 加入 800  $\mu$  l LB 培养基重悬菌体后涂布于 TYE 固体培养基 (成分: 1% (W/V) 胰蛋白胨, 0.5% (W/V) 酵母提取物, 0.8% (W/V) NaCl, 1.5% (W/V) 琼脂, pH 7.0) 平板上 (涂板时采用  $10^{-2}$  ~  $10^{-6}$  梯度稀释来测定滴度), 37 $^{\circ}$ C 恒温箱过夜培养 12 ~ 16h 至菌落长出。
- [0100] 18) 收集 TYE 固体培养基平板上长出的菌落, 进行下一轮淘选或加入等体积 50% (V/V) 甘油保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。
- [0101] 实施例 9: 小量表达 ELISA 鉴定淘选抗体库
- [0102] 1) 实施例 8 完成三轮淘选后, 用灭菌牙签从 TYE 固体培养基平板上随机挑取 48 个单克隆菌接种到装有 180  $\mu$  l 2TY 培养基 (含 1% (W/V) 葡萄糖, 100  $\mu$  g/ml Amp) 的 96 孔培养板中, 将培养板于 37 $^{\circ}$ C, 150r/min 振荡过夜培养 16h。
- [0103] 2) 从每孔中取 20  $\mu$  l 菌液加入到新的装有 180  $\mu$  l 2TY 培养基 (含 1% (W/V) 葡萄糖, 100  $\mu$  g/ml Amp) 的 96 孔培养板中, 37 $^{\circ}$ C, 150r/min 振荡培养 6h。
- [0104] 3) 4 $^{\circ}$ C, 1800r/min 离心 10min, 弃上清。
- [0105] 4) 加入 180  $\mu$  l 新的 2TY 培养基 (含 100  $\mu$  g/ml Amp 和 1mM 异丙基硫代 - $\beta$ -D- 半乳糖苷 (IPTG)) 至培养板中, 25 $^{\circ}$ C, 150r/min 振荡过夜诱导表达 12 ~ 16h。
- [0106] 5) 4 $^{\circ}$ C, 1800r/min 离心 10min, 每孔中取 100  $\mu$  l 上清用于伏马菌素 ELISA 鉴定。
- [0107] 6) 在 ELISA 板孔中加入 100  $\mu$  l FB1-BSA (1ng/ $\mu$  l), 37 $^{\circ}$ C 水浴包被 2h。
- [0108] 7) 用 200  $\mu$  l PBS 洗涤 3 次。
- [0109] 8) 用 FB1-BSA 包被的孔及其对照孔中分别加入 150  $\mu$  l 封闭液 (含 3% (W/V) BSA 的 PBS 溶液), 于 37 $^{\circ}$ C 水浴封闭 2h。
- [0110] 9) 用 200  $\mu$  l PBS 分别洗涤 3 次, 每次 3min。
- [0111] 10) 用 FB1-BSA 包被的孔及对照孔中分别加入 50  $\mu$  l 步骤 5) 收集的上清, 并加入 50  $\mu$  l 封闭液, 37 $^{\circ}$ C 反应 2h。
- [0112] 11) 用 200  $\mu$  l PBST 和 PBS 分别洗涤 3 次, 每次 3min。
- [0113] 12) 每孔加入 100  $\mu$  l 封闭液稀释 (体积比为 1 : 5000) 的抗 His 单克隆抗体 (购自天根生化科技 (北京) 有限公司), 37 $^{\circ}$ C 反应 1.5h。
- [0114] 13) 用 200  $\mu$  l PBST 和 PBS 分别洗涤 3 次, 每次 3min。
- [0115] 14) 每孔加入 100  $\mu$  l 封闭液稀释 (体积比为 1 : 5000) 的碱性磷酸酶 (AP) 标记的羊抗鼠 Fc 特异抗体 (购自 Sigma 公司), 37 $^{\circ}$ C 反应 1.5h。
- [0116] 15) 用 200  $\mu$  l PBST 和 PBS 分别洗涤 3 次, 每次 3min。

[0117] 16) 每孔加入 100  $\mu$ l 显色液 (0.1% (W/V) 对硝基苯磷酸二钠溶液), 黑暗条件下反应 15 ~ 30min。

[0118] 17) 每孔加入 50  $\mu$ l NaOH 溶液 (3M) 终止反应, 用酶标仪测 OD<sub>405</sub> 读值。

[0119] 小量表达 ELISA 鉴定结果显示, 48 个单克隆样品中有 45 个显色, 样品 OD<sub>405</sub> 值与阴性对照 OD<sub>405</sub> 值之比 P/N 值最高达到 35.4, 说明筛选得到了对伏马菌素亲和力和高的单链抗体。选取其中 16 个 OD<sub>405</sub> 读值较高的单克隆培养菌液送北京六合华大基因科技股份有限公司测序, 结果显示 16 个单克隆菌中所含的单链抗体基因完全相同, 其核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO:1 所示, 其氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO:2 所示, 并将该单链抗体命名为 FB-Mu 1H3。含有该基因的大肠杆菌命名为重组大肠杆菌 XL1-BlueMRF'/pHENHi-1H3, 单克隆培养菌液加等体积 50% (V/V) 甘油保存于 -80℃ 冰箱。

[0120] 实施例 10: 重组大肠杆菌大量表达单链抗体 FB-Mu 1H3 及抗体回收

[0121] 1) 取 5  $\mu$ l 甘油保存的重组大肠杆菌 XL1-Blue MRF'/pHENHi-1H3 接种于 20ml 2TY 培养基 (含 1% (W/V) 葡萄糖, 100  $\mu$ g/ml Amp) 中, 37℃, 200r/min 振荡过夜培养 12h。

[0122] 2) 取 8ml 过夜培养菌液加入 160ml 2TY 培养基 (含 1% (W/V) 葡萄糖, 100  $\mu$ g/ml Amp) 中, 37℃, 200r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.5 左右。

[0123] 3) 加入终浓度为 1mM 的 IPTG, 置于 30℃, 200r/min 诱导表达 8h。

[0124] 4) 取培养菌液分装到 50ml 离心管中, 4℃, 3000g 离心 10min。

[0125] 5) 每管中加入 500  $\mu$ l PPB 溶液 (30mM Tris-HCl, 20% (W/V) 蔗糖, pH 8.0) 重悬菌体, 再加入 1  $\mu$ l 乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液 (终浓度 1mM), 冰上放置 15min, 弃上清。

[0126] 6) 4℃, 3000g 离心 15min, 上清装入另一离心管中。

[0127] 7) 每管中加入 1ml MgCl<sub>2</sub> 溶液 (终浓度 5mM), 再加入 2  $\mu$ l EDTA 溶液 (终浓度 1mM), 冰上放置 15min。

[0128] 8) 4℃, 3000g 离心 15min, 上清与步骤 6) 上清合并。

[0129] 9) 取收集步骤 6) 和 8) 上清的离心管于 4℃, 12000r/min 离心 15min。

[0130] 10) 取上清用 PBS 透析。

[0131] 实施例 11: 用 Ni-NAT 柱纯化大量表达的单链抗体 FB-Mu 1H3

[0132] 1) 安装纯化柱 (购自 BIO-RAD 公司), 加入 400  $\mu$ l 充分混匀的基质 (购自 QIAGEN 公司), 使其固定 2h 以上。

[0133] 2) 剪去下端封口, 使液体流下, 用 5ml PBS 进行平衡。

[0134] 3) 加入实施例 2 回收的单链抗体样品过柱, 收集保存过柱后的样品流出液。

[0135] 4) 加 1ml 缓冲液 B (50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20mM 咪唑) 洗脱纯化柱 3 次, 分别收集洗脱液为 B1、B2、B3 (杂蛋白)。

[0136] 5) 加 400  $\mu$ l 缓冲液 C (50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 250mM 咪唑) 洗脱纯化柱 3 次, 分别收集洗脱液为 C1、C2、C3 (目的蛋白)。

[0137] 6) 加 5ml PBS 平衡纯化柱, 加入 1ml 30% (V/V) 酒精 4℃ 保存纯化柱。

[0138] 7) 目的蛋白 (单链抗体) 通过 SDS-PAGE 电泳检测后用 PBS 透析。

[0139] 实施例 12: SDS-PAGE 电泳检测和 Western blot 分析表达纯化的单链抗体 FB-Mu 1H3

[0140] 1) SDS-PAGE 电泳检测: 取 10  $\mu$ l 实施例 11 纯化的单链抗体 FB-Mu 1H3, 加入

2.5  $\mu$ L 5 $\times$  十二烷基硫酸钠 (SDS) 加样缓冲液 (250mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% (W/V) SDS (电泳级), 0.5% (W/V) 溴酚蓝, 50% (V/V) 甘油, 5% (W/V)  $\beta$ -巯基乙醇), 充分混匀, 水浴煮沸 5min, 然后置于冰上备用。参照 J. 萨姆布鲁克等 [美], 《分子克隆实验指南》, 科学出版社, 2003 年, 第三版介绍的方法制备分离胶和浓缩胶, 加入 1 $\times$ Tris-甘氨酸电泳缓冲液 (25mM Tris, 250mM 甘氨酸, 0.1% (W/V) SDS), 取放置在冰上的样品上样, 先用 80 伏电压电泳 20min, 再用 120 伏电压电泳 80 ~ 120min 至溴酚蓝跑至分离胶外。取下凝胶, 去掉浓缩胶后用染色液 (0.1% (W/V) 考马斯亮蓝 R-250, 25% (V/V) 异丙醇, 10% (V/V) 冰醋酸) 染色 30min, 然后用脱色液 (5% (V/V) 甲醇, 7.5% (V/V) 冰醋酸) 脱色 3 ~ 5 次, 即可观察照相, 结果如图 8 所示, 可见约 28kD 和 30kD 大小的两条目的蛋白, 出现两条大小不同的目的蛋白条带可能是表达抗体的不同构象造成的。

[0141] 2) Western blot 分析: 按 SDS-PAGE 检测所述方法进行 SDS-PAGE 电泳后的凝胶不经染色液染色, 直接用 BIO-RAD 公司 Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semi-Dry Transfer Cell 半干转印装置将凝胶中的蛋白转印到尼龙膜上, 于 200mA 恒定电流转膜 25min。转印结束后, 将尼龙膜转移到含有封闭液 (5% (W/V) 脱脂奶粉, 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl) 的杂交盒中, 室温平缓摇动 15 ~ 20min 后放置 37 $^{\circ}$ C 2h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。然后倒掉封闭液, 加入 10ml TBST (20mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 0.1% (V/V) Tween20) 洗涤 3 次, 每次 5min。再加入 10ml 经 TBST 稀释 (体积比为 1 : 5000) 的抗 His 单克隆抗体 (购自天根生化科技 (北京) 有限公司), 室温平缓摇动 2h 后倒掉, 用 10ml TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5min。再加入 10ml 经 TBST 缓冲液稀释 (体积比为 1 : 5000) 的 AP 标记羊抗鼠 Fc 特异抗体 (购自 Sigma 公司), 室温平缓摇动 2h 后倒掉, 用 10ml TBST 和 TBS (20mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl) 分别洗涤 5 次, 每次 5min。最后用 BCIP/NBT 显色试剂盒 (购自武汉博士德生物工程有限公司, 按照试剂盒说明书操作) 显色 10 ~ 20min 后, 用蒸馏水终止反应, 即可观察并照相。结果如图 9 所示, 在约 33kD 和 36kD 大小处出现特异性条带, 表明表达的抗体完整性较好, 能够在重组大肠杆菌中正常表达。特异条带大小与 SDS-PAGE 电泳条带大小不一致, 可能是由于预染蛋白分子量标准因与染料共价偶联而在 SDS-PAGE 电泳时的迁移特性发生某些改变的缘故而造成的。

[0142] 实施例 13: 纯化的单链抗体 FB-Mu 1H3 用于伏马菌素检测

[0143] 1) 在 ELISA 板孔中加入 100  $\mu$ l FB1-BSA (2.5ng/ $\mu$ l), 37 $^{\circ}$ C 水浴包被 2h。

[0144] 2) 用 200  $\mu$ l PBS 洗涤 3 次。

[0145] 3) 用 FB1-BSA 包被的孔及其对照孔中分别加入 150  $\mu$ l 封闭液 (3% (W/V) BSA 溶液), 37 $^{\circ}$ C 水浴封闭 2h。

[0146] 4) 用 200  $\mu$ l PBS 洗涤 3 次, 每次 3min。

[0147] 5) 每孔加入 100  $\mu$ l 封闭液稀释的实施例 11 纯化的单链抗体 FB-Mu 1H3 (200 ~ 500nM), 37 $^{\circ}$ C 反应 2h。

[0148] 6) 用 200  $\mu$ l PBST 和 PBS 分别洗涤 3 次, 每次 3min。

[0149] 7) 每孔加入 100  $\mu$ l 封闭液稀释 (体积比为 1 : 5000) 的抗 His 单克隆抗体 (购自天根生化科技 (北京) 有限公司), 37 $^{\circ}$ C 反应 1.5h。

[0150] 8) 用 200  $\mu$ l PBST 和 PBS 分别洗涤 3 次, 每次 3min。

[0151] 9) 每孔加入 100  $\mu$ l 封闭液稀释 (体积比为 1 : 5000) 的 AP 标记的羊抗鼠 Fc 特

异抗体 (购自 Sigma 公司), 37°C 反应 1.5h。

[0152] 10) 用 200  $\mu$  l PBST 和 PBS 分别洗涤 3 次, 每次 3min。

[0153] 11) 每孔加入 100  $\mu$  l 显色液 (0.1% (W/V) 对硝基苯磷酸二钠溶液), 黑暗条件下反应 15 ~ 30min。

[0154] 12) 每孔加入 50  $\mu$  l NaOH 溶液 (3M) 终止反应, 用酶标仪测 OD<sub>405</sub> 读值。

[0155] 加入显色液显色 30min 后, 样品 OD<sub>405</sub> 值与阴性对照 OD<sub>405</sub> 值之比 P/N = 24.5, 说明重组大肠杆菌大量表达纯化的单链抗体 FB-Mu 1H3 对伏马菌素仍有很高的亲和力。

[0156] 表 1cDNA 第一链合成及 PCR 扩增所用引物序列表

[0157]

引物名称	引物序列
Primer 1	GGCCAGTGGATAGACAGA
Primer 2	TAACCTWGACCAGGCATCC
Primer 3	GCTGATGCTGCACCAACTGTATCCGTCGACGCGCCGCGACTAGT
Primer 4	TTTCCACCTTCTCTGARGAGCTTGTGACGCGCCGCGACTAGT
Primer 5	GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAKGTRCAGCTTCAGGAGTCRGA
Primer 6	GCGGCCAGCCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGAAGSAGTCWGM
Primer 7	GCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTTCAGCTGCARCAGTCWGD
Primer 8	GCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTCCARCTGCAGSARYCTGGR
Primer 9	GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTTAGCTGCAGCAGTCTGGG
Primer 10	GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGARGTGAAGCTGGTGGARTCTGGR
Primer 11	GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGAAGCTTCTCGAGTCTGGA
Primer 12	GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGARGTGAAGCTKGAKGAGWCTGR
Primer 13	GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAVGTGMWGCTKGTGGAGTCTGGK
Primer 14	GCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTTCAGCTKCAGCAGTCTGGA
Primer 15	TCCAGAACCGCCACCGCCGCTACCGCCGCCACCTGMRGAGACDGTGASMGTRGTC
Primer 16	TCCAGAACCGCCACCGCCGCTACCGCCGCCACCTGMRGAGACDGTGASMGTRTG
Primer 17	TCCAGAACCGCCACCGCCGCTACCGCCGCCACCTGMRGAGACDGTGASCAGRGTC
Primer 18	TCCAGAACCGCCACCGCCGCTACCGCCGCCACCTGMRGAGACDGTGASTGARGTT

[0158]

Primer 19	AGCGGCGGTGGCGGTTCTGGAGGCGGCGGTTCTGACATTGTGMTGWCACAGTC
Primer 20	AGCGGCGGTGGCGGTTCTGGAGGCGGCGGTTCTGATRITKTGATGACCCARAC
Primer 21	AGCGGCGGTGGCGGTTCTGGAGGCGGCGGTTCTRAMATTGTGMTGACCCAATC
Primer 22	AGCGGCGGTGGCGGTTCTGGAGGCGGCGGTTCTSAAAWTGKTSACCCAGTC
Primer 23	AGCGGCGGTGGCGGTTCTGGAGGCGGCGGTTCTGAYATYCAGATGACMCAGWC
Primer 24	AGCGGCGGTGGCGGTTCTGGAGGCGGCGGTTCTCARSYTGKSTSACTCAGKMATCT
Primer 25	ACTAGTCGGGCCGCGTCGACAGCMCGTTTCAGYTCCARYTT
Primer 26	ACTAGTCGGGCCGCGTCGACAGCMCGTTTKATYTCCARYTT
Primer 27	ACTAGTCGGGCCGCGTCGACAGCMCGTTTBAKYTCTATCTTTGT
Primer 28	ACTAGTCGGGCCGCGTCGACCTGRCCTAGGACAGTSASYTTGGT
Primer 29	GCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGC
Primer 30	ATTCAGATCCTTCTGAGATGAG



Trp Gly Gln Gly Thr Ser Ile Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
115	120
ggc ggt ggc ggt tct gga ggc ggc ggt tct gac att gtg ctg aca cag	432
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln	
130	135
tct caa aaa ttc atg tcc aca tca gta ggg gac agg gtc agc atc acc	480
Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr	
145	150
tgc aag gcc agt cag aat gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag	528
Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln	
165	170
aaa cca gga caa tct cct aaa cta ctg att tac tcg gca tcc aat cgg	576
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg	
180	185
tac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat	624
Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp	
195	200
ttc act ctc acc atc agc aat atg cag tct gaa gac ctg gca gat tat	672
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr	
210	215
ttc tgc cag caa tat agc agc tat ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc	720
Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr	
225	230
aag ctg gaa ctg aaa cgt gct gtc gac gcg gcc gca gaa caa aaa ctc	768
Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Val Asp Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu	
245	250
atc tca gaa gag gat ctg aat cat cac cat cac cat cac ggg gcc gca	816
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn His His His His His His Gly Ala Ala	
260	265
tag	819
<210> 2	
<211> 272	
<212> PRT	
<213> 小鼠 (Mus musculus)	
<400> 2	
Met Ala Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro	
1	5
Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser	
20	25
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu	
35	40
Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp	
50	55
	60

[0003]

Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Lys Tyr Gly Asn Tyr Val Ser Ala Leu Asp Phe  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Ile Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln  
 130 135 140  
 Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr  
 145 150 155 160  
 Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln  
 165 170 175  
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg  
 180 185 190  
 Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 195 200 205  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr  
 210 215 220  
 Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr  
 225 230 235 240  
 Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Val Asp Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu  
 245 250 255  
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn His His His His His His Gly Ala Ala  
 260 265 270

- <210> 3
- <211> 363
- <212> DNA
- <213> 小鼠 (Mus musculus)
- <220>
- <221> gene
- <222> (1).. (363)
- <223>
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1).. (363)
- <223>
- <400> 3

gag gtg gag ctt gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48  
 Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt agc tat 96

[0004]

```

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20                25                30
gcc atg tct tgg gtt cgc cag act ccg gag aag agg ctg gag tgg gtc      144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
      35                40                45
gca acc att agt agt ggt ggt agt tac acc ttt tat cca gac act gta      192
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Thr Val
      50                55                60
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aat aac ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
      65                70                75                80
ctg caa atg agc cgt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt      288
Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
      85                90                95
gta aga cat aag tat ggt aac tac gtg agt gct ttg gac ttc tgg ggt      336
Val Arg His Lys Tyr Gly Asn Tyr Val Ser Ala Leu Asp Phe Trp Gly
      100                105                110
caa gga act tca atc aca gtc tcc tca      363
Gln Gly Thr Ser Ile Thr Val Ser Ser
      115                120

```

<210> 4

<211> 121

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 4

```

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

```

<210> 5

[0005]

<211> 327  
 <212> DNA  
 <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 <220>  
 <221> gene  
 <222> (1)..(327)  
 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(327)  
 <223>  
 <400> 5  
 gac att gtg ctg aca cag tct caa aaa ttc atg tcc aca tca gta ggg 48  
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggt act gct 96  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 20 25 30  
 gta gcc tgg tat caa cag aaa cca gga caa tct cct aaa cta ctg att 144  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 tac tcg gca tcc aat cgg tac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192  
 Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc aat atg cag tct 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser  
 65 70 75 80  
 gaa gac ctg gca gat tat ttc tgc cag caa tat agc agc tat ccg ctc 288  
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu  
 85 90 95  
 acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gaa ctg aaa cgt gct 327  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala  
 100 105

<210> 6

<211> 109

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 6

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

[0006]



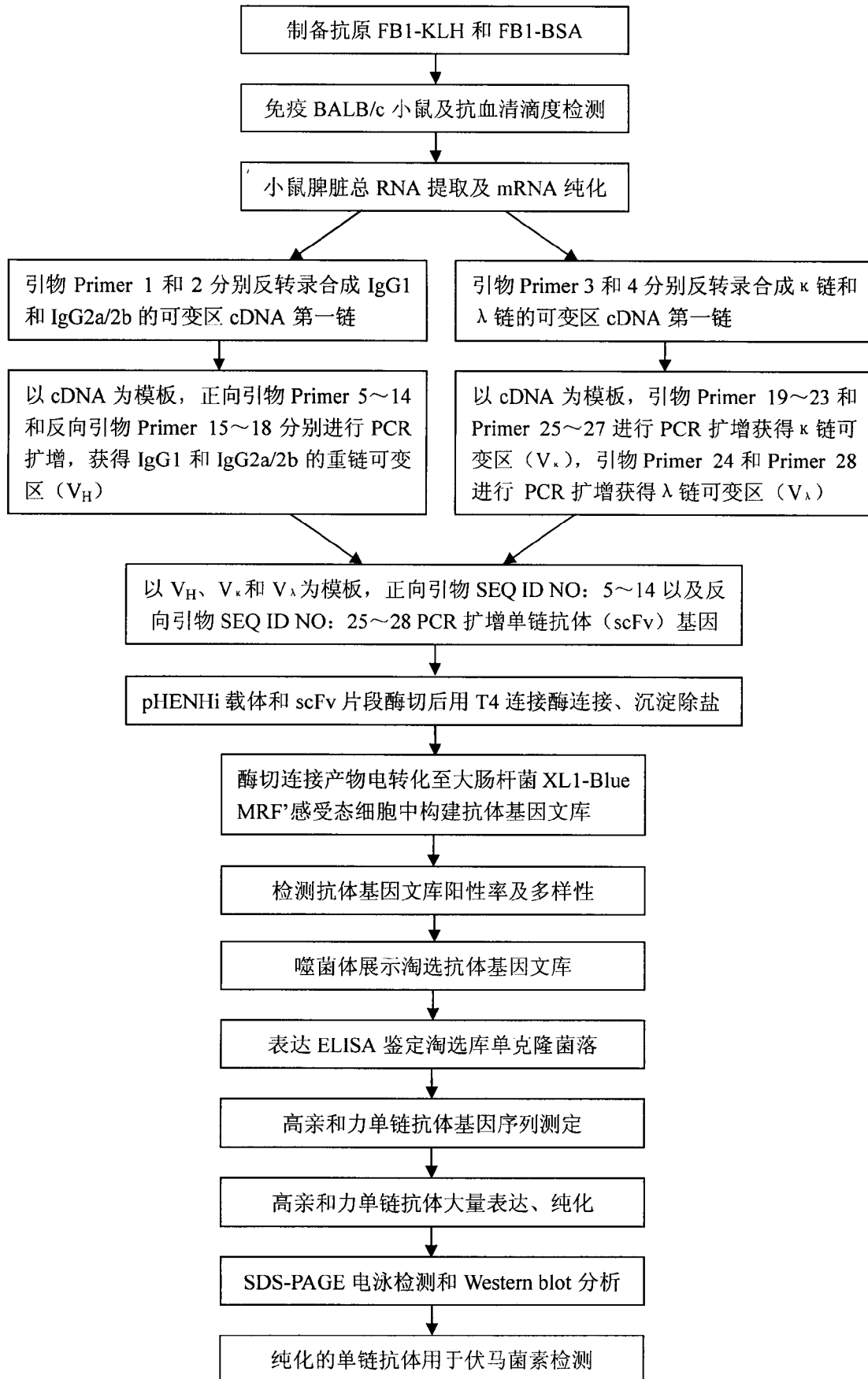


图 1

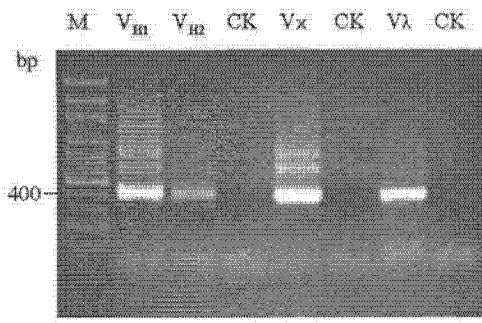


图 2

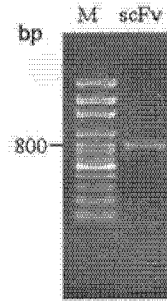


图 3

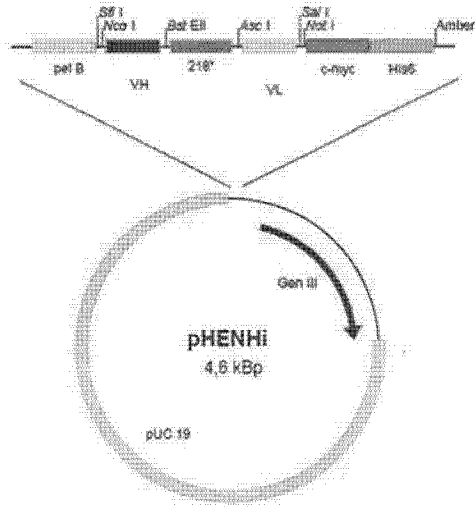


图 4

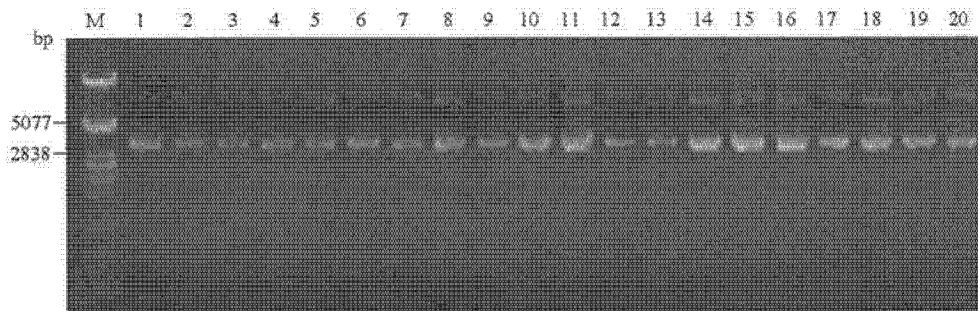


图 5

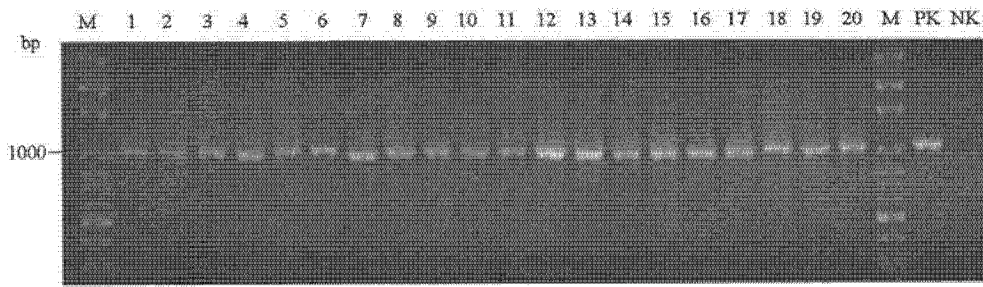


图 6

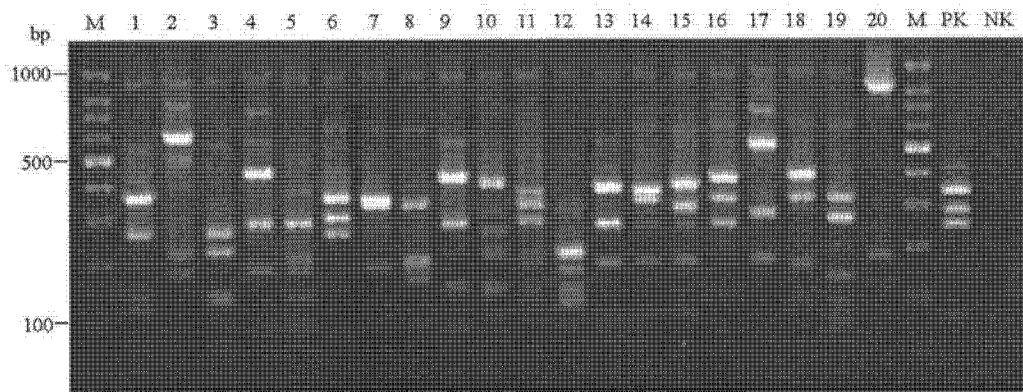


图 7

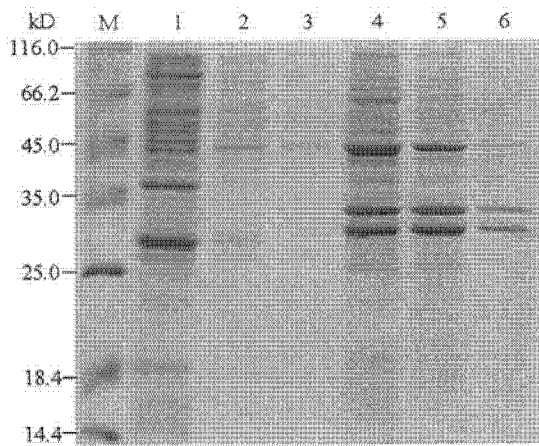


图 8

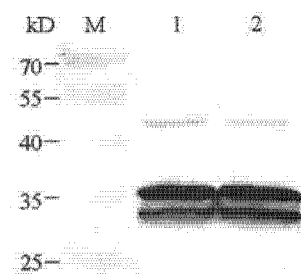


图 9

专利名称(译)	抗伏马菌素单链抗体的筛选及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN102453093B</a>	公开(公告)日	2013-10-30
申请号	CN201010527116.2	申请日	2010-10-28
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	廖玉才 李和平 胡祖权 张静柏		
发明人	廖玉才 李和平 胡祖权 张静柏		
IPC分类号	C07K16/14 C12N15/11 G01N33/53		
代理人(译)	王敏锋		
审查员(译)	王金凤		
其他公开文献	CN102453093A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于基因工程技术领域，具体涉及一种抗伏马菌素单链抗体的筛选及其在伏马菌素免疫学检测方面的应用。直接从偶联的抗原FB1-KLH免疫的小鼠脾脏细胞出发，利用分子克隆方法和技术构建单链抗体基因文库，再通过噬菌体展示技术筛选、表达ELISA鉴定及序列测定，最后获得一个高亲和力的抗伏马菌素单链抗体及其编码基因，命名为FB-Mu1H3。该单链抗体在大肠杆菌中进行大量表达纯化后可直接应用于伏马菌素的检测，包括在检测田间作物、饲料、粮食或食品伏马菌素污染中的应用。

