



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105622758 A

(43) 申请公布日 2016.06.01

(21) 申请号 201410593859.8

(22) 申请日 2014.10.29

(71) 申请人 中国科学院上海生命科学研究院
地址 200031 上海市徐汇区岳阳路 319 号

(72) 发明人 姚刚 王娟 姜忍忍 依布拉音

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陈静

(51) Int. Cl.

C07K 16/44(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 7/01(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书18页
序列表3页 附图9页

(54) 发明名称

特异性识别重金属 Cd 的纳米抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及特异性识别重金属 Cd 的纳米抗体及其应用。揭示了针对重金属 Cd 的纳米抗体,所述的纳米抗体对于重金属 Cd 具有良好的特异性,与其它金属的交叉反应性很低。本发明的纳米抗体可灵敏检测重金属 Cd,重复性好,结果稳定。利用所述的纳米抗体,可制备方便、快速且准确地检测重金属 Cd 的试剂盒。

1. 一种特异性识别重金属 Cd 的纳米抗体,其特征在于,所述的纳米抗体的互补决定区具有下组的氨基酸序列:

SEQ ID NO:2 所示的 CDR1,

SEQ ID NO:3 所示的 CDR2,和

SEQ ID NO:4 所示的 CDR3。

2. 如权利要求 1 所述的纳米抗体,其特征在于,所述的纳米抗体的骨架区具有下组的氨基酸序列:

SEQ ID NO:5 所示的 FR1,

SEQ ID NO:6 所示的 FR2,

SEQ ID NO:7 所示的 FR3,和

SEQ ID NO:8 所示的 FR4。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的纳米抗体,其特征在于,所述的纳米抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

4. 一种多核苷酸,其特征在于,其编码权利要求 1-3 任一所述的纳米抗体。

5. 一种纳米抗体噬菌体,其特征在于,其包括:噬菌体,以及展示于噬菌体表面的权利要求 1-3 任一所述的纳米抗体。

6. 权利要求 1-3 任一所述的纳米抗体或权利要求 5 所述的纳米抗体噬菌体的用途,用于检测重金属 Cd;或用于制备检测重金属 Cd 的试剂或试剂盒。

7. 一种用于检测重金属 Cd 的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒中包括权利要求 1-3 任一所述的纳米抗体或权利要求 5 所述的纳米抗体噬菌体。

8. 如权利要求 7 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中还包括固相载体,所述的纳米抗体或纳米抗体噬菌体被固定于固相载体或游离存在。

9. 如权利要求 7 或 8 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中还包括:

能与所述的纳米抗体连接的可检测标记物,所述的可检测标记物被连接于所述的纳米抗体或分离地存在于试剂盒;和/或

Cd 标准品或 Cd 偶联物标准品;和/或

与可检测标记物相对应的底物;和/或

酶联免疫反应试剂;和/或

说明检测重金属 Cd 的方法的使用说明书。

10. 一种检测待测样品中重金属 Cd 存在情况的方法,其特征在于,所述方法包括:

以权利要求 1-3 任一所述的纳米抗体或权利要求 5 所述的纳米抗体噬菌体作为重金属 Cd 的检测抗体,通过酶联免疫反应法来检测待测样品中重金属 Cd 的存在情况。

11. 一种筛选特异性识别重金属 Cd 的纳米抗体的方法,其特征在于,所述方法包括:

(1) 将 Cd 分别与载体蛋白 BSA、OVA 偶联,分别获得 Cd 与 BSA 偶联物和 Cd 与 OVA 偶联物;

(2) 分别以 (1) 获得的 Cd 与 BSA 偶联物和 Cd 与 OVA 偶联物作为抗原,筛选纳米抗体库,富集与之特异性结合的纳米抗体;筛选方案为以 Cd 与 BSA 偶联物和 Cd 与 OVA 偶联物交替进行筛选,筛选 3-8 轮;

(3) 应用酶联免疫反应法来鉴定特异性识别重金属 Cd 的纳米抗体,获得特异性良好的

纳米抗体。

特异性识别重金属 Cd 的纳米抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及单克隆抗体技术领域,更具体地,本发明涉及特异性识别重金属 Cd 的纳米抗体及其应用。

背景技术

[0002] 随着工业的迅速发展,镉 (Cd) 的生产和使用不断增加,环境镉污染及其引起的疾病不时可见报导。最近研究表明,一般人群中低剂量镉环境暴露即可引起肾功能损伤、骨矿密度降低、钙排泄增加及生殖毒性。因此检测环境中或样品中的重金属镉的存在与否以及存在量是非常重要的。

[0003] 传统的重金属离子检测方法主要有原子吸收光谱法、紫外分光光度法、阳极溶出伏安法、示波极谱法和各种仪器联用技术,如电感耦合等离子体质谱法、电感耦合等离子体原子发射光谱分析等;这些分析方法虽然能够对环境中的镉离子进行有效分析,而且测量精度较高,但它们大多需要大型仪器,成本高,样品要经过消解,检测步骤烦琐,不适合现场、在线分析检测,难以适应现场抽查、大规模检测的需求。

[0004] 重金属免疫检测方法为重金属污染物检测提供了另一种方式,这种方法检测速度快、费用低廉、易于现场使用。但是,重金属的免疫检测的关键在于重金属特异性抗体的制备。由于重金属离子带有电荷,能与动物体内生物分子发生强烈的不可逆反应,导致动物中毒,因此,常规的制备抗体的方法得不到理想的抗体。并且,重金属离子本身分子量很小不具有免疫原性,且其本身带有电荷,会与分子发生强烈的不可逆反应,所以需选择合适的载体蛋白以制成完全的免疫原。

[0005] 然而,即使获得了合适的携带重金属离子的免疫原,后续筛选抗体的过程仍然存在较多的瓶颈,特别是在完全免疫原中金属离子很小,筛选过程中获得的特异性抗体很微小,甚至难以鉴定到;而针对完全免疫原中金属离子以外的材料如螯合剂、载体蛋白的特异性抗体将占很大比例;因此筛选难度远远高于常规的单抗筛选方法。

[0006] 综上,本领域需要开发用于检测重金属 Cd 的免疫检测抗体,以期应用于实时重金属检测。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供特异性识别重金属 Cd 的纳米抗体及其应用。

[0008] 在本发明的第一方面,提供一种特异性识别重金属 Cd 的纳米抗体,所述的纳米抗体的互补决定区具有下组的氨基酸序列:

[0009] SEQ ID NO:2 所示的 CDR1,

[0010] SEQ ID NO:3 所示的 CDR2,和

[0011] SEQ ID NO:4 所示的 CDR3。

[0012] 在一个优选例中,所述的纳米抗体的骨架区具有下组的氨基酸序列:

[0013] SEQ ID NO:5 所示的 FR1,

[0014] SEQ ID NO:6 所示的 FR2,

[0015] SEQ ID NO:7 所示的 FR3,和

[0016] SEQ ID NO:8 所示的 FR4。

[0017] 在另一优选例中,所述的纳米抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0018] 在本发明的另一方面,提供一种多核苷酸,其编码所述的纳米抗体。

[0019] 在本发明的另一方面,提供一种表达载体,该表达载体中含有所述的多核苷酸。

[0020] 在另一优选例中,所述的多核苷酸可以通过分子克隆技术克隆至表达载体 pET28a 中,进行表达。

[0021] 在本发明的另一方面,提供一种宿主细胞(为非繁殖细胞),该宿主细胞中含有所述的表达载体或其基因组中整合有所述的多核苷酸。

[0022] 在本发明的另一方面,提供一种产生纳米抗体的方法,包括:培养所述的宿主细胞,使之表达所述的纳米抗体。

[0023] 在本发明的另一方面,提供一种纳米抗体噬菌体(噬菌粒),其包括:噬菌体(噬菌粒),以及展示于噬菌体表面的所述的纳米抗体。

[0024] 在另一优选例中,所述的噬菌体是商业化噬菌体,即是常规用于进行蛋白展示的噬菌体。例如,所述的噬菌体是 M13 丝状噬菌体。

[0025] 在本发明的另一方面,提供所述的纳米抗体或所述的纳米抗体噬菌体的用途,用于检测重金属 Cd;或用于制备检测重金属 Cd 的试剂或试剂盒。

[0026] 在另一优选例中,所述的用途为非诊断性的用途。较佳地,用于检测来自人体或动物体以外的样品(如水、药品、食品、农药、饲料、饮品、保健品等)中的重金属 Cd。

[0027] 在本发明的另一方面,提供一种用于检测重金属 Cd 的试剂盒,所述的试剂盒中包括所述的纳米抗体或所述的纳米抗体噬菌体。

[0028] 在一个优选例中,所述试剂盒中还包括固相载体,所述的纳米抗体或纳米抗体噬菌体被固定于固相载体(如多孔板、盖玻片、微珠)或游离存在。

[0029] 在另一优选例中,所述试剂盒中还包括:

[0030] 能与所述的纳米抗体连接的可检测标记物(如 HRP),所述的可检测标记物被连接于所述的纳米抗体或分离地存在于试剂盒;和/或

[0031] Cd 标准品或 Cd 偶联物(为 Cd 与载体蛋白的偶联物,如 Cd-DTPA-BSA、Cd-DTPA-OVA)标准品;和/或

[0032] 与可检测标记物相对应的底物;和/或

[0033] 酶联免疫反应试剂(包括但不限于:包被(缓冲)液,洗涤(缓冲)液,封闭液,固定液,终止液,显色液);和/或

[0034] 说明检测重金属 Cd 的方法的使用说明书。

[0035] 在本发明的另一方面,提供一种检测待测样品中重金属 Cd 存在情况的方法,所述方法包括:

[0036] 以所述的纳米抗体或所述的纳米抗体噬菌体作为重金属 Cd 的检测抗体,通过酶联免疫反应法来检测待测样品中重金属 Cd 的存在情况。

[0037] 在另一优选例中,将待测样品包被于固相载体上,以携带或不携带可检测标记物(以携带可检测标记物的抗抗体进一步结合)的所述的纳米抗体或所述的纳米抗体噬菌体

作为检测抗体,检测重金属 Cd 的存在情况。

[0038] 在另一优选例中,所述的方法为非诊断性的方法。所述的待测样品是来自人体或动物体以外的样品(如水、药品、食品、农药、饲料、饮品、保健品等)。

[0039] 在本发明的另一方面,提供一种筛选特异性识别重金属 Cd 的纳米抗体的方法,所述方法包括:

[0040] (1) 将 Cd 分别与载体蛋白 BSA、OVA 偶联,分别获得 Cd 与 BSA 偶联物和 Cd 与 OVA 偶联物;

[0041] (2) 分别以(1)获得的 Cd 与 BSA 偶联物和 Cd 与 OVA 偶联物作为抗原,筛选纳米抗体库,富集与之特异性结合的纳米抗体;筛选方案为以 Cd 与 BSA 偶联物和 Cd 与 OVA 偶联物交替进行筛选,筛选 3-8 轮;

[0042] (3) 应用酶联免疫反应法来鉴定特异性识别重金属 Cd 的纳米抗体,获得特异性良好的纳米抗体。

[0043] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0044] 图 1、本发明的实施例中进行的研究工作的整体流程步骤示意图。

[0045] 图 2、SDS-PAGE 分子量检测的结果。其中,1、Marker ;2、BSA ;3、DTPA-BSA ;4、Cd-DTPA-BSA ;5、OVA ;6、DTPA-OVA ;7、Cd-DTPA-OVA ;8、Cd-DTPA-BSA 超滤液 ;9、Cd-DTPA-OVA 超滤液。

[0046] 图 3、抗原紫外检测图谱。

[0047] 图 4、噬菌体 VHH 库的富集筛选示意图。

[0048] 图 5、Cd-DTPA 抗体库第一至七轮抗体库富集度。

[0049] 图 6、Cd-DTPA 抗体库富集度及特异性检测。

[0050] 图 7、第四轮单克隆 ELISA 验证。

[0051] 图 8、第六轮单克隆 ELISA 验证。

[0052] 图 9、Cd- 单克隆噬菌体 VHH- 螯合物竞争性 ELISA 示意图。

[0053] 图 10、第四轮阳性单克隆特异性初检测。

[0054] 图 11、第六轮阳性单克隆特异性初检测。

[0055] 图 12、Cd-VHH- 螯合物竞争性 ELISA 结果。

[0056] 图 13、Cd-DTPA-VHH 4-18 亲和常数 K_{aff} 测定。

[0057] 图 14、Cd-DTPA-VHH 4-18 与 DTPA 浓度关系摸索结果。

[0058] 图 15、Cd-DTPA-VHH 4-18 与 Cd-DTPA 及 DTPA 间接竞争性 ELISA。

[0059] 图 16、间接竞争性 ELISA 标准抑制曲线。

[0060] 图 17、测定 Cd- 单克隆抗体 (Cd-DTPA-VHH 4-18) 与其他重金属的交叉反应的间接竞争性 ELISA 标准抑制曲线。

[0061] 图 18、间接竞争性 ELISA 检测法检测加强的水样。

具体实施方式

[0062] 本发明人经过深入的研究和试验,揭示了一种针对重金属 Cd 的纳米抗体,所述的纳米抗体对于重金属 Cd 具有良好的特异性,与其它金属的交叉反应性很低。本发明的纳米抗体可灵敏检测重金属 Cd,重复性好,结果稳定;利用所述的纳米抗体,可制备方便、快速且准确地检测重金属 Cd 的试剂盒。

[0063] 术语

[0064] 如本文所用,所述的“纳米抗体”是指缺失轻链的重链抗体(如:来源于骆驼体内),克隆其可变区得到的单域抗体,是最小的功能性抗原结合片段,相对分子质量(Mr) 仅为 15000。纳米抗体具有分子质量小、稳定性强、可溶性好、易表达,免疫原性低等特点。

[0065] 如本文所用,所述的“检测抗体”是指特异性地抗重金属 Cd 的抗体。

[0066] 如本文所用,所述的“可检测标记物”是指位于检测抗体上的,用于确定待检测样品中重金属 Cd 的存在与否以及存在的量的标志物。如:酶、荧光标记、核素、量子点、胶体金等。优选的,所述的标记物选自:辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酯酶(AP)、葡萄糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶、脲酶、过氧化氢酶、或葡萄糖淀粉酶。

[0067] 如本文所用,所述的“与可检测标记物相对应的底物”是指可被检测抗体的标记物所催化显色,用于显示检测抗体与重金属 Cd 发生结合的识别信号。所述的底物比如:用于辣根过氧化物酶的邻苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)、ABTS;用于碱性磷酸酯酶的对硝基苯磷酸酯(p-nitrophenyl phosphate, p-NPP);等等。

[0068] 抗重金属 Cd 蛋白的纳米抗体

[0069] 本发明提供了一种纳米抗体,所述的纳米抗体筛选自驼源性天然单域重链抗体库。

[0070] 本发明所述的纳米抗体,能高亲和力特异性与重金属 Cd 结合。

[0071] 本发明也包括所述的纳米抗体的变异体、衍生物和类似物。如本文所用,术语“变异体”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的纳米抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽变异体、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或多肽原序列,或融合多肽)。根据本文的定义这些变异体、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0072] 此外,在所述的纳米抗体的氨基端或羧基端还可添加其它基本上不影响本发明所述的纳米抗体的活性、表达量和稳定性的氨基酸序列。较佳地,这些添加的氨基酸序列有利于表达(如信号肽),有利于纯化(如6×His序列),或其它可促进所述的纳米抗体的活性、表达量或稳定性的序列。

[0073] 本发明还包括编码本发明的纳米抗体或其变异体、衍生物的 DNA 分子。所述的 DNA 分子可以全部人工合成,也可用 PCR 扩增的方法获得。

[0074] 为了进一步提高宿主细胞的表达量,可以对本发明的纳米抗体的编码序列进行改造,例如采用宿主细胞偏好的密码子,消除不利于基因转录及翻译的序列。

[0075] 在获得了编码本发明新纳米抗体或其变异体、衍生物的 DNA 序列之后,将其克隆入合适的表达载体,再转入合适的宿主细胞。最后,培养转化后的宿主细胞,通过分离纯化

得到本发明的新的纳米抗体。

[0076] 如本文所用,术语“载体”包括质粒、表达载体、克隆载体、病毒载体等。可选用本领域已知的各种载体。比如,选用市售的载体,然后将编码本发明新纳米抗体的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列,可以形成表达载体。

[0077] 在本发明中,术语“宿主细胞”包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。用于表达纳米抗体的宿主细胞包括大肠杆菌、酵母细胞、昆虫细胞、COS 细胞、CHO 细胞等。较佳地,该宿主细胞是原核细胞,更佳地是大肠杆菌细胞。

[0078] 在获得转化的宿主细胞后,可在适合表达本发明纳米抗体的条件下培养该细胞,从而表达出纳米抗体;然后再分离出表达的纳米抗体。

[0079] 试剂盒

[0080] 基于本发明获得的新的纳米抗体,本发明提供一种检测重金属 Cd 的试剂盒,所述的试剂盒可用于重金属 Cd 的检测。所述的试剂盒含有:本发明所述的纳米抗体或纳米抗体噬菌体(噬菌粒)。

[0081] 作为一种实施方式,可以将待测样品包被于固相载体上,以本发明的纳米抗体作为检测抗体进行检测,所述的纳米抗体可连接一可检测标记物,或可以与连接可检测标记物的另一抗体(抗抗体)结合,从而获知待测样品中重金属 Cd 的存在情况。应理解,在获得了本发明的纳米抗体后,可以采取多种本领域已知的方式来实施重金属 Cd 的检测,这些方式均包含在本发明中。

[0082] 在确定了本发明的试剂盒所采用的检测抗体后,可以采用本领域常规可用于与检测抗体结合来进行检测的各种标记物作为可检测标记物。本发明对所采用的标记物没有特别的限制,只要是能够与所述的检测抗体结合,且在适当处理后能够准确地指示待检测样品中重金属 Cd 的存在与否以及存在量的标记物均是可用的。例如,所述的标记物可以选自(但不限于):辣根过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、葡萄糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶、脲酶、过氧化氢酶、或葡萄糖淀粉酶。例如,所述的检测抗体采用辣根过氧化物酶(HRP)标记。抗体标记的方法在本领域是公知的,例如用简易过碘酸钠法或者戊二醛二步法进行 HRP 标记抗体。

[0083] 当采用如上所示的一些酶标记物时,还需要采用一些与相应的酶结合的底物,从而可通过显色等方式来报导标记物的存在情况或者存在量。所述的底物例如(但不限于):用于辣根过氧化物酶的邻苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)、ABTS;用于碱性磷酸酯酶的对硝基苯磷酸酯(p-nitrophenyl phosphate, p-NPP)。

[0084] 为了消除假阳性和假阴性,宜在检测过程中设置质控(对照)。所述的质控品例如采用重金属 Cd 标准品。此外,为了获得定量结果,可以在检测过程中设置含已知浓度的多个重金属 Cd 的标准品。对于标准品的设置方法可采用常规的方法。利用所述的标准品,标准曲线如下设置:用标准品的 OD 值检测结果为纵坐标(Y轴),标准品浓度为横坐标(X轴)绘制成重金属 Cd 试剂盒的定量标准曲线。从而,根据待测样品检测获得的 OD 值,利用标准曲线可计算出待测样品中重金属 Cd 的浓度。

[0085] 此外,为了使本发明的试剂盒在检测时更方便,所述的试剂盒中优选的还包含其它一些辅助试剂,所述的辅助试剂是酶联免疫试验中常规使用的一些试剂,这些试剂的特性以及它们的配制方法均是本领域技术人员所熟知的。所述的试剂例如(但不限于):显

色剂、洗涤液、终止液，增敏稀释液。

[0086] 所述的包被抗体被包被在固相载体上。本发明对所采用的固相载体没有特别的限制，只要其能够与包被抗体相偶联（连接）即可。例如，所述的固相载体选自：微量滴定板（又称为多孔板，如 96 孔板）或微球。

[0087] 在本发明的一个实例中，采用的固相载体是微量滴定板（酶标板），所述的微量滴定板是一种聚苯乙烯板，规格是 12×8 可拆卸条板。

[0088] 由于本发明的试剂盒采用的纳米抗体配合单克隆抗体对于重金属 Cd 具有极其优异的结合特性（高特异性）。按照上述方法，只要设置已知浓度的抗原对照，制作浓度标准曲线，通过比照浓度标准曲线就可以得出待测样品中的重金属 Cd 含量。

[0089] 本发明首次获得一种对于重金属 Cd 特异性良好的纳米抗体，能够快速检验重金属 Cd，检测过程方便快捷成本低，且抗体扩增稳定性强。本发明为有效检测重金属 Cd 提供了一种优异的试剂。

[0090] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 J. 萨姆布鲁克等编著，分子克隆实验指南，第三版，科学出版社，2002 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

[0091] 本发明的实施例中进行的研究工作的整体流程步骤参照图 1。

[0092] 实施例 1、重金属完全抗原的制备及鉴定

[0093] 1、完全抗原的制备

[0094] 本发明人所用的噬菌体抗体库展示技术是固相纯化抗原筛选的一种筛选方法，重金属离子本身分子量很小不具有免疫原性无法对其进行固相化，且其本身带有电荷，会与分子发生强烈的不可逆反应，所以与载体蛋白（BSA、OVA）偶联形成完全抗原再进行筛选。这里本发明人利用一种双功能螯合剂 p-SCN-Bn-DTPA（简称 DTPA）——既能与金属离子螯合又能与载体蛋白偶联，从而得到完全抗原 Cd-DTPA-BSA、Cd-DTPA-OVA 及无金属抗原 DTPA-BSA、DTPA-OVA。

[0095] 重金属离子与螯合剂的螯合：

[0096] 取一定量的 DTPA 溶液（10mg/ml）于无菌的 1.5ml EP 管中，用 0.1M PH7.4 的 HEPES 缓冲液稀释，然后以 Cd^{2+} 与 DTPA 摩尔比为 4:1 的比例逐滴缓慢地加入 Cd^{2+} 溶液，边加边缓慢振荡，调 PH 7.0 后用封口膜将管口封好，然后将上混合液转移至旋转培养器上，25℃ 下螯合反应 16h。

[0097] 螯合物 Cd-DTPA 与载体蛋白的偶联：

[0098] 取一定量的载体蛋白溶液 BSA 和 OVA，使得蛋白与螯合剂的摩尔比为 30:1，于一新的 1.5ml EP 管中（0.1M PH9.0 HEPES 缓冲液稀释），然后将螯合好的螯合物取出，缓慢的加入到蛋白稀释液中，边加边缓慢混匀，调 PH 至 PH 9.0 后用封口膜将管口封好，然后于旋转培养器上，25℃ 下偶联反应 24h。同时，制备一批无金属抗原，即 DTPA-BSA/OVA（步骤同螯合物与载体蛋白的偶联）。

[0099] 超滤：

[0100] 偶联结束后，将混合物转移至预先处理好的 Millipore 超滤管（先用去离子水冰浴 0.5h，再用预冷的 HBS 缓冲液冰浴 0.5h）中，BSA 抗原用 30KD 的超滤管，OVA 抗原用 10KD

超滤管。先用 0.01M PH 9.0 的 HEPES 缓冲液稀释（终体积为 3mI）超滤 1 次,然后再用 0.1M PH 7.4 的 HEPES 缓冲液稀释超滤 3 次,分别于 3500rpm,4℃离心 10min,最后两次均用移液枪小心吹洗滤膜,以免膜上有蛋白残留,超滤结束后小心将内管底部的液体吸出,即为完全抗原 Cd-DTPA-BSA/OVA,及无金属抗原 DTPA-BSA/OVA;收集超滤液进行检测以观察是否有蛋白损失。

[0101] 2、完全抗原的鉴定

[0102] 对于制备的抗原,包括完全抗原 (Cd-DTPA-BSA、Cd-DTPA-OVA) 及无金属抗原 (DTPA-BSA、DTPA-OVA) 进行鉴定,其中最直观也是最主要的是 SDS-PAGE 分子量检测,另外同时进行紫外及质谱鉴定。

[0103] SDS-PAGE 分子量检测的结果如图 2。

[0104] 通过 SDS-PAGE 检测结果:与载体蛋白组对比,DTPA-载体蛋白、重金属-DTPA-载体蛋白的分子量逐渐变大,蛋白胶中迁移速率逐渐变慢,三者形成明显的梯度,可以初步证明完全抗原制备是成功的。

[0105] 紫外鉴定的结果如图 3。抗原组与载体蛋白的吸收峰发生了明显的迁移:单纯的载体蛋白 BSA 的主要吸收峰为 278nm 处,DTPA-BSA 的吸收峰移至约 275nm 处,而完全抗原 Cd-DTPA-BSA 则无明显的吸收峰;OVA 组,单纯的载体蛋白 OVA 在 275nm 处有一个主要的吸收峰,DTPA-OVA 则在 270nm 处有一个吸收峰,而 Cd-DTPA-OVA 在 265nm 处达到最高值。完全抗原组既有载体蛋白的特征,也有半抗原 Cd-DTPA 的特性,可以判断完全抗原制备是成功的。

[0106] 质谱鉴定的结果如表 1。根据质谱检测结果,与对照组相比,Cd 的含量要远远高于对照组,说明完全抗原重金属的整合是成功的。

[0107] 表 1、抗原质谱鉴定结果

[0108]

0.000	Cd
样品名	Conc. (ppb)
对照 (control)	7.7762
Cd-DTPA-BSA	1522.9059
Cd-DTPA-OVA	952.3095

[0109] 通过 SDS-PAGE,紫外鉴定及质谱检测 (图 2,3 及表 1),可以证明本发明人成功制备了完全抗原 Cd-DTPA-BSA 和 Cd-DTPA-OVA。由于完全抗原的成功制备是获得重金属抗体的首要条件,为之后的抗体筛选奠定基础,可以用于之后的抗体筛选工作。

[0110] 实施例 2、Cd- 纳米抗体库的筛选、富集

[0111] 1、筛选

[0112] 在驼类、鲨鱼等动物体内存在特殊的单链抗体,这种抗体天然缺少轻链,故称为重链抗体 (Heavy-Chain Antibodies,HCAbs),重链可变区上可以结合的抗原最小单位称之为 VHH 抗体 (Variable domain of Heavy chain of Heavy chain antibody,VHH),分子量约

13kDa, 又称为 Nanobody。因其分子量小、易穿透组织, 而使其很容易接近靶目标表面的沟、裂缝以及被隐藏的抗原表位, 能够识别许多传统抗体无法识别的抗原结合位点; 另外, VHH 还具有稳定性高, 水溶性高, 易表达, 成本低且可以无限量扩增, 以及与特定抗原决定表位结合的空间位阻小等优势, 这使得其在疾病的诊断等相关的试剂盒研制等方面有很大的优势。

[0113] 将未经免疫的骆驼体内的免疫 B 细胞中的 VHH mRNA 反转录为 cDNA, 然后将可变区克隆到噬菌粒 (Phagemid) 内, 将重组的噬菌粒转化入 E. coli TG1 中, 最后在辅助噬菌体 M13K07 (购自美国 Stratagene 公司) 的辅助下包装、扩增, 利用噬菌体展示技术将 VHH 蛋白片段展示在 M13K07 的表面, 形成驼源性的天然单域重链抗体 (VHH) 库。

[0114] 因为重金属 Cd (或重金属螯合物 Cd-DTPA) 分子很小, 抗体库中特异性针对 Cd (或 Cd-DTPA) 的抗体很少, 有很多针对载体蛋白或是整合剂等抗体。所以, 为了降低非特异性, 本发明人采用两种抗原即 Cd-DTPA-BSA 和 Cd-DTPA-OVA 交替进行抗体库的筛选, 即第二轮筛选时包被的是抗原 Cd-DTPA-OVA, 后面的几轮依次交替筛选, 筛选进行七轮。由于抗原的交替, 所以加抗体库的时候也要同时加入相对应的载体蛋白共同孵育, 以吸附一些非特异性抗体降低非特异性, 图 4 所示即为抗体库筛选步骤。

[0115] 纳米抗体第一轮库的富集步骤如下:

[0116] 先准备宿主菌: 取冻存的 TG1 甘油菌, 在无菌操作台将 TG1 菌液以划线法划于 LB 平板上, 以便于次日挑单菌落。

[0117] (1) 抗原包被

[0118] 取一定量的抗原 Cd-DTPA-BSA 加入到一定碳酸盐包被缓冲液 ($\text{pH} = 9.6$), 使其浓度为 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$, 加入 Nunc 孔中, $250 \mu\text{I}/\text{孔}$, 共 3 孔, 37°C 包被 2h;

[0119] (2) 准备宿主菌:

[0120] 前日过夜培养的 TG1 平板, 挑取一个单菌落于新鲜的 $2\times\text{TY}$ 培养基 (10mL) 中, 37°C 摇床扩增培养, 保证在第 7 步侵染时其 OD600 达到 $0.4 \sim 0.6$;

[0121] (3) 乙醇胺封闭

[0122] 10mM 的乙醇胺溶液封闭活性位点: 包被结束, 将孔内液体扣干, 用无菌的 $1\times\text{PBS}$ 加满孔洗涤 10 次, 然后加入 10mM 的乙醇胺溶液, $300 \mu\text{I}/\text{孔}$, 37°C 封闭 1h;

[0123] (4) BSA 封闭

[0124] 3% 的 BSA 封闭潜在蛋白结合位点: 将孔内液体扣干, 用无菌的 $1\times\text{PBS}$ 加满孔洗涤 10 次, 然后加入 3% 的 BSA, $300 \mu\text{I}/\text{孔}$, 37°C 封闭 1.5h;

[0125] (5) 加原始 VHH 抗体库

[0126] 取原始噬菌体 VHH 库液 $300 \mu\text{I}$ (共约 10^{13} 个噬菌体) 与 $300 \mu\text{I}$ 3% 的 BSA 混合 (降低非特异性), 然后以 $200 \mu\text{I}/\text{孔}$ 的体积加入 Nunc 孔中, 于微量振荡器室温振荡 40min, 然后室温静置 1h;

[0127] (6) 噬菌体洗脱、中和

[0128] 无菌的 $1\times\text{PBST}$ 洗涤 10 次, 后 PBS 洗涤 10 次, 尽量甩干孔内的残留液体, 然后加入 10mM 的 HCl 洗脱液 $200 \mu\text{I}/\text{孔}$, 于微量振荡器室温振荡洗脱 30min; 将洗脱液小心吸出 (吸出的时候可以用移液枪小心吹打, 以增加洗脱量), 加入到新的无菌的 50mL 离心管中, 然后加入 $200 \mu\text{I}$ 的 0.1M Tris-HCl 混匀中和;

[0129] (7) 噬菌体抗体库侵染宿主菌

[0130] 将洗脱中和后的噬菌体加入到 5mI OD600 = 4.0-6.0 的新鲜的 TG1 菌液中, 37℃ 静置 40min ;

[0131] (8) 洗脱计数

[0132] 取适量侵染液用 2×TY 培养基稀释, 以 10 倍梯度稀释 (10^{-1} - 10^{-12}), 取 10 μ I 的各稀释度的细胞液于 LB- 氨苄平板上涂布, 37℃ 孵箱内孵育过夜, 寻找平板上菌落数量在 100 ~ 200 之间的平板计算洗脱下来的噬菌体的数目 ; 剩余的洗脱中和液加入 5mI 新鲜的 2×TY 培养基, 37℃ 再摇荡培养 30min ;

[0133] (9) 辅助噬菌体 M13K07 侵染

[0134] 加 5 μ I 的 M13K07 噬菌体 (约 10^{12} 个) 于上侵染液中, 37℃ 静置侵染 1h, 然后于 4800rpm 室温离心 10min, 弃上清, 沉淀重悬于 50mI 新鲜的 2×TY 培养基中, 加 Amp 至 100 μ g/mL, Kan 至 50 μ g/mL, 葡萄糖加至 0.1%, 然后于 30℃, 200rpm 振荡培养 16-20h ;

[0135] (10) 噬菌体的纯化

[0136] 过夜菌转移至 50mI 无菌离心管中, 4800rpm, 4℃ 离心 20min, 弃沉淀, 上清液转移到新的 50mI 离心管中, 加入 1/5 体积比的 40% PEG 4000&2.5M NaCl 溶液, 强烈振荡后冰浴 20min ; 然后再于 4800rpm, 4℃ 离心 20min, 弃上清, 用无菌的 1×PBS 缓冲液将沉淀重悬后用 0.22 μ M 滤膜过滤除菌, 并测其滴度, 即为筛选第一轮抗体库。

[0137] 第二、三、四、五、六、七轮的富集步骤同第一轮。采用两种抗原即 Cd-DTPA-BSA 和 Cd-DTPA-OVA 交替进行抗体库的筛选, 即第二轮筛选时包被的是抗原 Cd-DTPA-OVA, 后面的几轮依次交替。

[0138] 2、Cd- 纳米抗体库富集度及其特异性检测

[0139] 对多克隆抗体库进行初步验证, 以确定库中是否存在特异性针对重金属的抗体。因为重金属离子本身的分子量太小, 针对其的抗体也较少。因此先测定 Cd-DTPA 抗体库第一至七轮抗体库富集度。并且, 即使通过抗原交替的方式筛选得到的抗体库中也会存在有很多非特异的抗体, 如针对载体蛋白 BSA/OVA 的, 针对无金属偶联物 DTPA-BSA/DTPA-OVA 或是针对螯合剂 DTPA 的抗体, 所以需对其先进行特异性检测。Cd-DTPA VHH 库富集度及特异性的 ELISA 检测步骤如下 :

[0140] (1) 抗原包被 : 浓度均为 2.5 μ g/mL, 抗原包括 Cd-DTPA-BSA 和 Cd-DTPA-OVA, 阴性对照组包括 BSA 和 OVA 包被组及单纯的包被液组, 100 μ I/ 孔, 4℃ 包被 12h ;

[0141] (2) 1×PBST 洗涤 5 遍, 扣干孔内液体, 然后加入 5% 的脱脂奶粉封闭, 200 μ I/ 孔, 37℃ 封闭 1.5h ;

[0142] (3) 1×PBST 洗涤 5 遍, 扣干孔内液体, 每孔中分别加入不同轮次的 VHH 噬菌体 10^{11} 个, 用 5% 的脱脂奶粉稀释, 100 μ I/ 孔, 37℃ 静置 1h ;

[0143] (4) 1×PBST 洗涤 3 遍, 加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min, 重复一次上面的洗涤过程, 扣干孔内液体, 加入 HRP-Anti-M13K07 兔抗, 用 5% 的脱脂奶粉以 1:3000 稀释, 100 μ I/ 孔, 37℃, 1h ;

[0144] (5) 1×PBST 洗涤 3 遍, 加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min, 重复一次上面的洗涤过程, 扣干孔内液体, 加入显色底物液 A+B 液 (两者体积比 1:1) 显色, 100 μ I/ 孔, 显色时间根据阴性对照组定 ;

[0145] (6) 终止, 2M 的 H_2SO_4 , 50 μ I/ 孔 ;

[0146] (7) 酶标仪读取 OD450 值, 并分析结果。

[0147] 通过对比完全抗原 Cd-DTPA-BSA/OVA 和载体蛋白 BSA/OVA 组 (图 5 和图 6)。由图 5 可见, 每一轮筛选都能有效提高抗体富集程度。由图 5 和图 6 可见, 交替筛选抗体库后, 不仅具有很好的 Cd-DTPA 富集度而且也有很好的特异性, 这为之后的单克隆抗体挑选打下很好的基础。

[0148] 实施例 3、单克隆抗体阳性克隆筛选

[0149] 1、单克隆初步筛选——阳性筛选

[0150] 通过间接性 ELISA 验证 : 酶标板分别包被 Cd-DTPA-BSA 和 DTPA-BSA, 挑选仅对 Cd-DTPA-BSA 呈阳性而对 DTPA-BSA 呈阴性的克隆, 视为阳性克隆, 然后对它们进行下一步的验证。

[0151] 同步进行两组实验, 分别以 Cd-DTPA-BSA 和 DTPA-BSA 为抗原进行检测。具体过程如下 :

[0152] (1) 抗原包被 : 完全抗原 Cd-DTPA-BSA 和无金属抗原 DTPA-BSA 包被, 浓度均为 2.5 μ g/mL, 100 μ I/ 孔, 4 $^{\circ}$ C 包被 12h ;

[0153] (2) 1 $\times$ PBST 洗涤 5 遍, 扣干孔内液体, 然后加入 5% 的脱脂奶粉封闭, 200 μ I/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1.5h ;

[0154] (3) 1 $\times$ PBST 洗涤 5 遍, 扣干孔内液体, 将每个单克隆上清分别加入对应的孔内, 100 μ I/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 静置 1h ;

[0155] (4) 1 $\times$ PBST 洗涤 3 遍, 加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min, 重复洗涤如上, 扣干孔内液体, 加入 HRP-Anti-M13K07 兔抗, 用 5% 的脱脂奶粉以 1:3000 稀释, 100 μ I/ 孔, 37 $^{\circ}$ C, 1h ;

[0156] (5) 1 $\times$ PBST 洗涤 3 遍, 加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min, 重复洗涤如上, 扣干孔内液体, 加入显色底物液 A+B 液 (两者体积比 1:1) 显色, 100 μ I/ 孔, 显色时间根据阴性对照组定 ;

[0157] (6) 终止, 2M 的 H_2SO_4 , 50 μ I/ 孔 ;

[0158] (7) 酶标仪读取 OD450 值, 并进行数据分析。

[0159] 第四轮单克隆 ELISA 验证结果如图 7 ; 第六轮单克隆 ELISA 验证结果如图 8。

[0160] 经过阳性克隆初筛, 挑选其中阳性较好的克隆, 第四轮 : 2、4、6、7、9、11、14、16、17、18、19 及 20 号克隆 ; 第五轮 : 舍弃 3、4 及 11 号后的所有克隆 ; 第六轮 : 1、2、4、5、6、9、11、15、16、17、18、19 及 20 号克隆 ; 第七轮 : 2、3、4、5、6 和 10 号克隆, 对这些克隆进行进一步的验证 (Cd-DTPA/DTPA)。

[0161] 2、Cd- 阳性克隆特异性初步检测

[0162] 经过初步筛选, 对视为阳性的克隆进行初步特异性验证, 初步确定其特异性 : 因为通过完全抗原包被筛选得到的抗体对螯合剂会有很大的依赖性, 也就是说螯合剂本身可能对抗体就有一定的抑制作用 (也可视为假阳性), 抗体库中也存在很多的针对螯合剂的抗体, 所以为了排除螯合剂对抗体的影响及螯合剂抗体, 首先要对阳性克隆进行初步特异性排除。包被完全抗原, 然后用 DTPA 为竞争剂进行间接竞争性 ELISA, 挑选 DTPA 对其无影响的克隆进行下一步的验证。

[0163] Cd-单克隆噬菌体 VHH-螯合物竞争性 ELISA 示意图如图 9。进行螯合剂 DTPA 抗体的排除实验,具体步骤如下:

[0164] (1) 抗原包被:完全抗原 Cd-DTPA-BSA,浓度为 $2.5 \mu\text{g}/\text{mI}$, $100 \mu\text{I}/\text{孔}$, 4°C 包被 12h;

[0165] (2) $1\times\text{PBST}$ 洗涤 5 遍,扣干孔内液体,然后加入 5% 的脱脂奶粉封闭, $200 \mu\text{I}/\text{孔}$, 37°C 封闭 1.5h;

[0166] (3) 封闭的同时,准备好竞争剂,共两组: Cd-DTPA 和 DTPA 取配好的原 DTPA ($10\text{mg}/\text{mI}$) 溶液用 0.1M $\text{pH}7.4$ 的 HEPES 缓冲液稀释至终浓度为 1mM ,其中一半的 DTPA 溶液加入一定量的 Cd^{2+} 使其终浓度为 $10\mu\text{g}/\text{L}$ 制备成 Cd-DTPA,然后分别与初筛为阳性的克隆上清以 1:1 的比例混合,充分混匀后, 37°C 反应 45min;

[0167] (4) $1\times\text{PBST}$ 洗涤 5 遍,扣干孔内液体,将上混合液分别加入对应的孔内, $100 \mu\text{I}/\text{孔}$, 37°C 静置 1h;

[0168] (5) $1\times\text{PBST}$ 洗涤 3 遍,加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min,重复洗涤如上,扣干孔内液体,加入 HRP-Anti-M13K07 免抗,用 5% 的脱脂奶粉以 1:3000 稀释, $100 \mu\text{I}/\text{孔}$, 37°C 静置 1h;

[0169] (6) $1\times\text{PBST}$ 洗涤 3 遍,加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min,重复洗涤如上,扣干孔内液体,加入显色底物 A 液 +B 液 (两者体积比 1:1) 显色, $100 \mu\text{I}/\text{孔}$,显色时间根据阴性对照组定;

[0170] (7) 终止, 2M 的 H_2SO_4 , $50 \mu\text{I}/\text{孔}$;

[0171] (8) 酶标仪读取吸光值,并进行数据分析。

[0172] 第四轮阳性单克隆特异性初检测结果如图 10;第六轮阳性单克隆特异性初检测结果如图 11。

[0173] 第四至七轮阳性单克隆抗体特异性初步检测结果,可以看出,只有很少的单克隆抗体显示出很小的竞争性作用。分析原因:可能是抗体的亲和力不够,达不到 $10 \mu\text{g}/\text{L}$ 的检测限;也可能是实验组重金属离子 Cd^{2+} 与螯合剂的螯合不成功;另外,当然仍需进一步的优化实验。

[0174] 由上结果可以看出,随着富集轮次的增加,抗体库中针对螯合剂 DTPA 的抗体比例逐渐增多,而且阳性克隆率也逐渐的降低。所以,并不是筛选的轮次越高越好,虽然在筛选过程中轮次越高抗体的亲和力可能越高,但却不一定是适合所有实验的。正如本发明人针对小分子抗体的筛选实验,就必须要保证抗体库一定的多样性,因为本身完全抗原和单独的金属离子或金属螯合物是由区别的。尽管如此,本发明人可以看出,第四轮的 18(VHH4-18)、19 号(VHH4-19) 克隆及第六轮的 15 号(VHH6-15) 克隆显示出了较为理想的竞争作用的,所以挑选这几个克隆重新扩增纯化再进行进一步的验证实验。

[0175] 3、Cd-单克隆抗体(VHH)-螯合物竞争 ELISA

[0176] 通过对单克隆 VHH 4-18,4-19 及 6-15 的扩增、纯化,获得对应的噬菌体抗体即纳米抗体,分别与螯合物进行竞争性 ELISA(VHH 孵育浓度均为 $5\times 10^{10}\text{pfu}/\text{孔}$, $100 \mu\text{I}/\text{孔}$),观察这几个抗体的特异性及亲和力。以上所得的阳性克隆 4-18,4-19 及 6-15,取其所对应的原菌液以 1:100 的比例重新接种扩增、纯化,后用于进一步的特异性验证。

[0177] (1) 阳性克隆原菌液重新 1:100 接种于 10mI 新鲜的 $2\times\text{TY}$ 培养基 +Amp ($100 \mu\text{g}/$

mI), 37℃摇至 OD600 = 0.4-0.6;

[0178] (2) 辅助噬菌体 M13K07 侵染: 菌液中加入 5 μI 的 M13K07 噬菌体 (约 10¹² 个), 37℃静置侵染 1h;

[0179] (3) 侵染液于 4800rpm, 室温离心 10min, 弃上清, 沉淀重悬于 50mI 新鲜的 2×TY+Amp (100 μg/mL)+Kan (50 μg/mL)+IPTG (1mM), 30℃, 200rpm 振荡培养 16-20h;

[0180] (4) 噬菌体抗体的纯化: 将过夜菌转移到 50mI 无菌离心管中, 4800rpm, 4℃离心 20min, 将上清转移到新的 50mI 离心管中, 加入体积比为 1/5 的 40% PEG4000&2.5M NaCl 溶液, 强烈振荡后冰浴 20min; 然后再于 4800rpm, 4℃离心 20min, 弃上清, 沉淀重悬于适量无菌的 1×PBS 缓冲液中, 然后用 0.22 μM 的滤膜过滤除菌, 并进行滴度测定。

[0181] 对纯化后的抗体进行其与螯合物的竞争 ELISA 包括步骤:

[0182] (1) 抗原包被: 抗原 Cd-DTPA-BSA 用包被液稀释至 2.5 μg/mL, 包被 96 孔板; 阴性对照组: BSA 2.5 μg/mL 包被, 100 μI/孔, 4℃过夜;

[0183] (2) 5%的脱脂奶粉, 200 μI/孔, 37℃封闭 1.5h;

[0184] (3) 在一排 EP 管中, 建立从 2nmol/L-0.2mmol/L 浓度梯度的螯合物半抗原 PBS 溶液, 分别加入单克隆 VHH 稀释液, 5×10¹⁰/孔 (100 μI/孔), 37℃孵育 45min;

[0185] (4) 1×PBST 洗涤 5 遍, 扣干孔内液体, 将上混合液分别加入对应的孔内, 100 μI/孔, 37℃静置 1h;

[0186] (5) 1×PBST 洗涤 3 遍, 加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min, 重复洗涤如上, 扣干孔内液体, 加入 HRP-Anti-M13K07 兔抗, 用 5%的脱脂奶粉以 1:3000 稀释, 100 μI/孔, 37℃静置 1h;

[0187] (6) 1×PBST 洗涤 3 遍, 加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min, 重复洗涤如上, 扣干孔内液体, 加入显色底物 A 液+B 液 (两者体积比 1:1) 显色, 100 μI/孔, 显色时间根据阴性对照组定;

[0188] (7) 终止, 2M 的 H₂SO₄, 50 μI/孔;

[0189] (8) 酶标仪读取 OD450, 分析结果。

[0190] Cd-VHH-螯合物竞争性 ELISA 结果如图 12。通过初步定性实验表明, 三个单克隆噬菌体抗体中, Cd-DTPA-VHH4-18 表现出较好的亲和力, Cd-DTPA-VHH 6-15 只显示出较弱的亲和力, 而 Cd-DTPA-VHH 4-19 则完全没有结合。

[0191] 就与竞争剂的相互作用: 由曲线可以看出, 在无竞争剂的情况下 Cd-DTPA-VHH4-18 表现出较好的亲和力, 随着 Cd²⁺ 离子浓度的增加, Cd-DTPA-VHH4-18 与固定在板上的抗原的结合能力呈现出显著的下降趋势, 证明 Cd²⁺ 离子对其有明显的竞争作用, 即 Cd-DTPA-VHH4-18 对重金属 Cd 具有很好的特异性。

[0192] 4、Cd-DTPA 单克隆 VHH 氨基酸序列的测定

[0193] 通过对 Cd-DTPA-VHH 4-18 的测序, 获得 Cd-DTPA-VHH 4-18 的可变区的氨基酸序列如下 (SEQ ID NO:1):

[0194]

MAEVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCTVSGYTLKNYYAIGWFRQVPGKER

FR1

CDR1

FR2

EGVSCFSRRVGSPFYADSVKGRFTISRDDAANTVYVLQMNSLNR

CDR2

FR3

[0195]

EDTANYYC**AIKRWPVDTRRRRDLVVGCPGRDEYEF**WGQGTQV

CDR3

FR4

TVSSGRY

[0196] VHH 氨基酸序列共分为 7 部分：4 个骨架区分别为 FR1 (SEQ ID NO:5)、FR2 (SEQ ID NO:6)、FR3 (SEQ ID NO:7) 及 FR4 (SEQ ID NO:8)，3 个超变区分别为 CDR1 (SEQ ID NO:2)、CDR2 (SEQ ID NO:3) 及 CDR3 (SEQ ID NO:4)；以上序列中标出的粗斜体部分为超变区，其余的为骨架区，符合典型的纳米抗体序列特点。

[0197] 重组表达纳米抗体的方法：首先，将 VHH 编码序列插入到 pET28a 载体的多克隆位点中，在宿主菌 Rosetta (购自全式金公司) 中进行蛋白表达，重组菌株表达方法如下：

[0198] (1) 取保存的甘油菌 20 μ l 于 10ml 含有 50 μ g/ml 卡那抗性的 LB 培养液中，37℃ 振荡培养过夜。

[0199] (2) 在 50ml 培养瓶中，取过夜培养液 500 μ l 加入含有 50ml 50 μ g/ml 卡那抗性的 LB 培养液中，37℃ 振荡培养至 OD600 达到 0.4-0.6。

[0200] (3) 各取 1ml 培养液测其 OD600 值，6000rpm 离心 3min，去上清。按 OD600 $\times$ 100 μ l 的量加入 1 $\times$ 上样缓冲液，作为未诱导对照。

[0201] (4) 诱导时加入相应的 0.5mM IPTG 浓度，30℃ 摇床培养。

[0202] (5) 诱导约 6 小时后收集菌液，取 40ml 菌液于 50ml 离心管中，6000rpm，4℃ 离心 15min，去上清。

[0203] (6) 以每 100ml 菌液加入 4ml 1 $\times$ PBS 的比例重悬湿菌，先用枪头打碎菌块，再混匀。

[0204] (7) 加入终浓度为 1mM 的 PMSF 蛋白酶抑制剂，防止目的蛋白降解。PMSF 有剧毒，拿装 PMSF 的试管时必须带上手套。

[0205] (8) 取 1ml PBS 重悬菌液于 1.5ml EP 管中超声，超声时 EP 管置于冰上。10s 超声，15s 间隔，200W，30 次循环。

[0206] (9) 超声后加入终浓度 2% Triton-100 帮助目的蛋白融解于上清，不会影响目的蛋白活性。

[0207] (10) 4℃，12000rpm 离心 15min。上清置于新 EP 管中，沉淀用 1ml PBS 充分重悬。

[0208] (11) 按比例加入 6 $\times$ 上样缓冲液，样品处理方法同前。

[0209] (12) SDS-PAGE 和蛋白免疫印记分析方法检验抗体表达情况。

[0210] (13) 选取小量抗体诱导表达中条件,在保证培养环境相同的情况下,扩大表达时 LB 的体积,以使抗体能在近似相同的条件下表达,表达出的抗体直接用于纯化。经验证,表达纯化后获得序列正确的纳米抗体。

[0211] 实施例 4、Cd- 单克隆抗体 (Cd-DTPA-VHH 4-18) 反应条件优化

[0212] 1、棋盘法最佳抗原抗体反应浓度摸索和常数 K_{aff} 测定

[0213] 用棋盘法 (抗原梯度包被,抗体梯度稀释) 摸索最佳抗原抗体反应浓度,并根据该结果计算抗体的亲和力,选择合适的抗原抗体浓度进行之后的特异性检测。在特定的抗原抗体浓度条件下,在最佳反应浓度条件下对其进行包被温度、包被时间及螯合物与抗体孔外孵育时间等条件进行摸索,确定最佳条件后,绘制间接竞争性 ELSA 抑制标准曲线。

[0214] 棋盘法具体步骤如下:

[0215] 抗原 (Cd-DTPA-BSA/OVA)、抗体 (Cd-DTPA-VHH 4-18) 棋盘法测其最佳抗原抗体浓度条件,并通过非竞争性 ELISA 法计算该 VHH 的亲合常数 K_{aff} 。

[0216] (1) 抗原包被:抗原 Cd-DTPA-BSA 梯度包被,四个浓度梯度分别为 $5 \mu\text{g/mL}$ 、 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $1.25 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.625 \mu\text{g/mL}$,碳酸盐包被缓冲液稀释后包被 96 孔板,阴性对照组包被对应浓度的 BSA, $100 \mu\text{I/孔}$, 4°C 包被过夜;

[0217] (2) 5% 的脱脂奶粉, $200 \mu\text{I/孔}$, 37°C 封闭 1.5h;

[0218] (3) 抗体孵育:用 5% 的脱脂奶粉梯度稀释,抗体浓度分别为 8.3nM 、 1.66nM 、 0.332nM 依次梯度稀释至 $5.312 \times 10^{-4}\text{nM}$,共七个梯度;

[0219] (4) $1 \times \text{PBST}$ 洗涤 5 遍,扣干孔内液体,将上各梯度的抗体稀释液分别加入对应的孔内, $100 \mu\text{I/孔}$, 37°C 静置 1h;

[0220] (5) $1 \times \text{PBST}$ 洗涤 3 遍,加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min,重复洗涤如上,扣干孔内液体,加入 HRP-Anti-M13K07 兔抗,用 5% 的脱脂奶粉以 $1:3000$ 稀释, $100 \mu\text{I/孔}$, 37°C 静置 1h;

[0221] (6) $1 \times \text{PBST}$ 洗涤 3 遍,加满洗涤液后于微量振荡器上振荡 4min,重复洗涤如上,扣干孔内液体,加入显色底物 A 液 +B 液 (两者体积比 $1:1$) 显色, $100 \mu\text{I/孔}$,显色时间根据阴性对照组定;

[0222] (7) 终止, 2M 的 H_2SO_4 , $50 \mu\text{I/孔}$;

[0223] (8) 酶标仪读取吸光值 (OD_{450}),并进行数据分析。

[0224] 通过该噬菌体抗体与抗原浓度关系的摸索 (图 13):随着抗体浓度的逐渐增加, OD_{450} 也逐渐增大,在最大浓度 $5 \times 10^{11}\text{pfu/孔}$ (即 8.3nM) 时开始进入平台期;而就抗原包被浓度,随着抗原浓度的增加,抗体与抗原的结合能力没有明显的增加,尤其是 $5 \mu\text{g/mL}$ 和 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 浓度条件下,增加的幅度很小,几乎接近平台期。

[0225] 所以,从实验灵敏性和经济两方面考虑,之后的验证选择的最佳抗原包被浓度为 $2.5 \mu\text{g/mL}$,抗体孵育浓度为 $5 \times 10^{10}\text{pfu/孔}$ (即 0.83nM), $100 \mu\text{I/孔}$ 。

[0226] 根据非竞争性亲和力计算法, $K_{\text{aff}} = (n-1)/2(n[\text{Ab}'] - [\text{Ab}])$,式中 $[\text{Ab}]$ 和 $[\text{Ab}']$ 分别代表当抗原浓度为 $[\text{Ag}]$ 和 $[\text{Ag}']$ 时 OD_{50} (即最大光吸收密度一半) 对应的抗体浓度 (mol/L), $n = [\text{Ag}]/[\text{Ag}']$ 。然后两两比较, $n = 8$ 时可得 1 个 K 值;当 $n = 4$ 时,可得 2 个 K 值; $n = 2$ 时可得 3 个 K 值;最后对 6 个 K 值求平均值作为即为最后结果。通过计算,该抗体 Cd-DTPA-VHH 4-18 的 K_{aff} 约为 $5.95 \times 10^8\text{L/mol}$ 。

[0227] 在最佳抗原抗体浓度条件下,通过对不同包被温度、时间及游离半抗原孔外孵育时间的优化,确定最优包被条件:4℃包被 12h;游离抗原与抗体孔外孵育时间:45min。

[0228] 2、VHH 与 DTPA 浓度关系摸索

[0229] 因为通过螯合剂将重金属离子与蛋白偶联制备的抗原筛选得到的抗体很大程度上要依赖于螯合剂,但浓度太高又会对抗原抗体的结合会有影响,所以需要确定抗体与 DTPA 的关系。DTPA 浓度:0mM,0.1mM,0.25mM,0.5mM,1mM,2mM 及 4mM,分别与稀释好的抗体 1:1 混和,充分混匀后于 37℃反应 45min。

[0230] (1) 抗原包被:抗原 Cd-DTPA-BSA 用包被液稀释至 2.5 μg/mL,包被 96 孔板;阴性对照组:BSA 2.5 μg/mL 包被,100 μL/孔,4℃过夜;

[0231] (2) 5%的脱脂奶粉,200 μL/孔,37℃封闭 1.5h;

[0232] (3) 在一排 EP 管中,分别建立从 0mM-4nM 浓度梯度的 DTPA,加入单克隆 VHH 4-18, 5×10^{10} /孔 (100 μL/孔),37℃孵育 45min

[0233] (4) 1×PBST 洗涤 5 遍,扣干孔内液体,将上混合液分别加入对应的孔内,100 μL/孔,37℃静置 1h;

[0234] (5) 1×PBST 洗涤 3 遍,加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min,重复洗涤如上,扣干孔内液体,加入 HRP-Anti-M13K07 兔抗,用 5%的脱脂奶粉以 1:3000 稀释,100 μL/孔,37℃静置 1h;

[0235] (6) 1×PBST 洗涤 3 遍,加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min,重复洗涤如上,扣干孔内液体,加入显色底物 A 液+B 液(两者体积比 1:1)显色,100 μL/孔,显色时间根据阴性对照组定;

[0236] (7) 终止,2M 的 H_2SO_4 ,50 μL/孔;

[0237] (8) 酶标仪读取 OD450,分析结果。

[0238] Cd-DTPA-VHH 4-18 与 DTPA 浓度关系摸索结果如图 14。由上述结果可以看出,与阳性对照组对比:随着 DTPA 浓度的增加会对抗原抗体的结合产生抑制作用,所以对抗体与 DTPA 的浓度关系摸索还是很有必要的,但是,由上结果:DTPA 浓度小于 1mM 的情况下对抗原抗体的结合是没有影响的,所以,之后的验证实验中螯合剂 DTPA 的含量应小于 1mM。

[0239] 3、VHH 与 Cd-DTPA 及 DTPA 间接竞争性 ELISA

[0240] 根据以上亲和常数测定时确定的最佳抗原抗体浓度:抗原 Cd-DTPA-BSA 2.5 μg/mL 包被,抗体孵育浓度为 5×10^{10} pfu/孔 (0.83nM) 进行间接竞争性 ELISA 检测。本次实验相对于前面的初步竞争性 ELISA:游离的半抗原 Cd-DTPA 向上增加一个梯度,即 0.402mM;另外同步进行抗体与螯合剂(DTPA)的竞争性 ELISA,直观对比两组实验结果:确定该抗体的特异性,也可以排除螯合剂 DTPA 的干扰(两组 DTPA 的浓度保持完全相同)。具体方法如下:

[0241] 平行进行两组实验,一组以 Cd-DTPA 为竞争剂,一组以 DTPA 为竞争剂。

[0242] (1) 抗原包被:抗原 Cd-DTPA-BSA 用包被液稀释至 2.5 μg/mL,包被 96 孔板;阴性对照组:BSA 2.5 μg/mL 包被,100 μL/孔,4℃过夜;

[0243] (2) 5%的脱脂奶粉,200 μL/孔,37℃封闭 1.5h;

[0244] (3) 在一排 EP 管中,分别建立从 0nM-0.1mM 浓度梯度的 Cd-DTPA 和 DTPA 竞争剂,单克隆 VHH 4-18 稀释液, 5×10^{10} /孔 (100 μL/孔),37℃孵育 45min

[0245] (4) 1×PBST 洗涤 5 遍,扣干孔内液体,将上混合液分别加入对应的孔内,100 μ I/孔,37℃静置 1h;

[0246] (5) 1×PBST 洗涤 3 遍,加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min,重复洗涤如上,扣干孔内液体,加入 HRP-Anti-M13K07 兔抗,用 5%的脱脂奶粉以 1:3000 稀释,100 μ I/孔,37℃静置 1h;

[0247] (6) 1×PBST 洗涤 3 遍,加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min,重复洗涤如上,扣干孔内液体,加入显色底物 A 液 +B 液 (两者体积比 1:1) 显色,100 μ I/孔,显色时间根据阴性对照组定;

[0248] (7) 终止,2M 的 H₂SO₄,50 μ I/孔;

[0249] (8) 酶标仪读取 OD450,分析结果。

[0250] Cd-DTPA-VHH 4-18 与 Cd-DTPA 及 DTPA 间接竞争性 ELISA 结果如图 15。通过两组平行试验的对比可以看出,该抗体是特异性识别重金属 Cd 的 (图 15 中箭头所指),所以可以对其进行下一步的特异性验证以及其与其他金属离子的交叉反应实验。箭头所指的两点,相同高浓度的 DTPA 条件下,DTPA 作为竞争剂无法与包被在板上的抗原竞争抗体,从而信号较强。而 Cd-DTPA 作为竞争剂能够与抗体结合,从而使抗体无法与包被在板上的抗原结合,在洗涤过程中被洗去,从而最终信号很弱。再次验证了该抗体能够特异性识别重金属 Cd。

[0251] 4、VHH 间接竞争性 ELISA 标准抑制曲线

[0252] 重金属离子 Cd²⁺ 梯度稀释于 1mM 的 DTPA 溶液中作为竞争剂,进行 ELISA 检测。

[0253] 抑制率 = $[(OD_{\max} - OD_{\min}) - (OD_x - OD_{\min})] / (OD_{\max} - OD_{\min})$

[0254] (1) 抗原包被:抗原 Cd-DTPA-BSA 用包被液稀释至 2.5 μ g/mL,包被 96 孔板;阴性对照组:BSA 2.5 μ g/mL 包被,100 μ I/孔,4℃过夜;

[0255] (2) 5%的脱脂奶粉,200 μ I/孔,37℃封闭 1.5h;

[0256] (3) 在一排 EP 管中,分别建立从 0.2mM-0nM 浓度梯度的 Cd²⁺ 竞争剂,分别加入单克隆 VHH 稀释液,5×10¹⁰/孔 (100 μ I/孔),37℃孵育 45min

[0257] (4) 1×PBST 洗涤 5 遍,扣干孔内液体,将上混合液分别加入对应的孔内,100 μ I/孔,37℃静置 1h;

[0258] (5) 1×PBST 洗涤 3 遍,加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min,重复洗涤如上,扣干孔内液体,加入 HRP-Anti-M13K07 兔抗,用 5%的脱脂奶粉以 1:3000 稀释,100 μ I/孔,37℃静置 1h;

[0259] (6) 1×PBST 洗涤 3 遍,加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min,重复洗涤如上,扣干孔内液体,加入显色底物 A 液 +B 液 (两者体积比 1:1) 显色,100 μ I/孔,显色时间根据阴性对照组定;

[0260] (7) 终止,2M 的 H₂SO₄,50 μ I/孔;

[0261] (8) 酶标仪读取 OD450,分析结果。

[0262] 以 Cd²⁺ 的浓度为横坐标,抑制率为纵坐标绘制标准曲线,如图 16,可以算出该抗体的最低检测限可以达到 0.2nM 即 20ng/L。

[0263] 实施例 5、Cd- 单克隆抗体 (Cd-DTPA-VHH 4-18) 与其他重金属的交叉实验

[0264] 运用建立的间接竞争性 ELISA 检测法,进行抗体与其他金属离子的交叉反应。选

择其他不同金属离子： Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} ，它们与金属镉与螯合剂 DTPA 螯合的步骤完全相同（见实施例 1），金属离子与 DTPA 摩尔比均为 4:1（螯合剂 DTPA 的量相同），然后用螯合好的金属螯合物分别进行竞争性 ELISA（所有条件与 Cd-DTPA 一致），结果进行对比。

[0265] (1) 抗原包被：抗原 Cd-DTPA-BSA 用包被液稀释至 $2.5 \mu\text{g/mL}$ ，包被 96 孔板；阴性对照组：BSA $2.5 \mu\text{g/mL}$ 包被， $100 \mu\text{L}$ /孔， 4°C 过夜；

[0266] (2) 5% 的脱脂奶粉， $200 \mu\text{L}$ /孔， 37°C 封闭 1.5h；

[0267] (3) 在一排 EP 管中，分别加入相同浓度不同金属螯合物作为竞争剂，分别加入单克隆 VHH 4-18， 5×10^{10} /孔（ $100 \mu\text{L}$ /孔）， 37°C 孵育 45min

[0268] (4) $1 \times \text{PBST}$ 洗涤 5 遍，扣干孔内液体，将上混合液分别加入对应的孔内， $100 \mu\text{L}$ /孔， 37°C 静置 1h；

[0269] (5) $1 \times \text{PBST}$ 洗涤 3 遍，加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min，重复洗涤如上，扣干孔内液体，加入 HRP-Anti-M13K07 兔抗，用 5% 的脱脂奶粉以 1:3000 稀释， $100 \mu\text{L}$ /孔， 37°C 静置 1h；

[0270] (6) $1 \times \text{PBST}$ 洗涤 3 遍，加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min，重复洗涤如上，扣干孔内液体，加入显色底物 A 液 + B 液（两者体积比 1:1）显色， $100 \mu\text{L}$ /孔，显色时间根据阴性对照组定；

[0271] (7) 终止，2M 的 H_2SO_4 ， $50 \mu\text{L}$ /孔；

[0272] (8) 酶标仪读取 OD450，分析结果。

[0273] 用不同金属离子的螯合物作为竞争剂，运用本发明人建立的间接竞争性 ELISA 法进行抗体与不同金属离子的交叉反应。由于此方法为间接竞争性 ELISA 方法，如果抗体与金属离子具有交叉性，则金属离子螯合物作为竞争剂可以竞争抗原与抗体的结合，从而使得最终结果为阴性。如抗体与 Cd 金属螯合物可以结合，则抗体只有少量与包被在板上的抗原结合，因此结果为阴性。而如果抗体与其它金属离子交叉性较小，则其金属螯合物不能与抗原竞争抗体，抗体依旧与包被在板上的抗原结合，因此最终结果为阳性。由图 17 可以看出，该抗体与其他金属离子（包括一价、二价及三价等不同价态的金属离子）没有交叉性或是交叉性很小（误差允许范围内），说明该抗体的特异性非常好。。

[0274] 实施例 6、水样加强回收实验（应用）

[0275] 取去离子水作为实验用水样，对其进行不同浓度重金属离子 Cd^{2+} 的加强实验，对加强的水样用建立的间接竞争性 ELISA 检测法检测，然后通过标准曲线对比，计算重金属回收率。

[0276] 在不含任何金属离子的超纯水中加入不同梯度的重金属螯合物 Cd-DTPA，运用建立的间接竞争性 ELISA 进行回收试验检测。

[0277] 取一定量的超纯水（无任何金属离子），设置依次为 0.402mM、0.201mM、20.1 μM 、2.01 μM 、0.201 μM 、20.1nM、2.01nM 七个稀释梯度，同时设置阳性对照及阴性对照组，具体方法如下：

[0278] (1) 抗原包被：抗原 Cd-DTPA-BSA 用包被液稀释至 $2.5 \mu\text{g/mL}$ ，包被 96 孔板；阴性对照组：BSA $2.5 \mu\text{g/mL}$ 包被， $100 \mu\text{L}$ /孔， 4°C 过夜；

[0279] (2) 5% 的脱脂奶粉， $200 \mu\text{L}$ /孔， 37°C 封闭 1.5h；

[0280] (3) 在一排 EP 管中, 建立从 0.402mM-2.01nM 浓度梯度的螯合物半抗原水样, 加入单克隆 VHH 4-18, 5×10^{10} / 孔 ($100 \mu\text{I}$ / 孔), 37°C 孵育 45min;

[0281] (4) $1 \times \text{PBST}$ 洗涤 5 遍, 扣干孔内液体, 将上混合液分别加入对应的孔内, $100 \mu\text{I}$ / 孔, 37°C 静置 1h;

[0282] (5) $1 \times \text{PBST}$ 洗涤 3 遍, 加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min, 重复洗涤如上, 扣干孔内液体, 加入 HRP-Anti-M13K07 兔抗, 用 5% 的脱脂奶粉以 1:3000 稀释, $100 \mu\text{I}$ / 孔, 37°C 静置 1h;

[0283] (6) $1 \times \text{PBST}$ 洗涤 3 遍, 加满洗涤液于微量振荡器上振荡 4min, 重复洗涤如上, 扣干孔内液体, 加入显色底物 A 液 +B 液 (两者体积比 1:1) 显色, $100 \mu\text{I}$ / 孔, 显色时间根据阴性对照组定;

[0284] (7) 终止, 2M 的 H_2SO_4 , $50 \mu\text{I}$ / 孔;

[0285] (8) 酶标仪读取 OD450, 分析结果。

[0286] 结果如图 18, 通过与标准曲线对比计算其重金属回收率, 最后本发明人得到的平均回收率可达 90% 以上。

[0287] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001]

序列表

<110> 中国科学院上海生命科学研究院

<120> 特异性识别重金属 Cd 的纳米抗体及其应用

<130> 143512

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> 骆驼(Camelidae)

<400> 1

Met Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Leu Lys
20 25 30

Asn Tyr Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg
35 40 45

Glu Gly Val Ser Cys Phe Ser Arg Arg Val Gly Ser Pro Phe Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Ala Asn
65 70 75 80

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Arg Glu Asp Thr Ala Asn
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Ile Lys Arg Trp Pro Val Asp Thr Arg Arg Arg Arg
100 105 110

Asp Leu Val Val Gly Cys Pro Gly Arg Asp Glu Tyr Glu Phe Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Arg Tyr
130 135 140

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 骆驼(Camelidae)

[0002]

<400> 2

Gly Tyr Thr Leu Lys Asn Tyr Tyr Ala
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 骆驼(Camelidae)

<400> 3

Phe Ser Arg Arg Val Gly Ser Pro Phe
1 5

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> 骆驼(Camelidae)

<400> 4

Ala Ile Lys Arg Trp Pro Val Asp Thr Arg Arg Arg Arg Asp Leu Val
1 5 10 15

Val Gly Cys Pro Gly Arg Asp Glu Tyr Glu Phe Trp
20 25

<210> 5

<211> 27

<212> PRT

<213> 骆驼(Camelidae)

<400> 5

Met Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 骆驼(Camelidae)

[0003]

<400> 6

Ile Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser
1 5 10 15

Cys

<210> 7

<211> 37

<212> PRT

<213> 骆驼(Camelidae)

<400> 7

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala
1 5 10 15

Ala Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Arg Glu Asp Thr
20 25 30

Ala Asn Tyr Tyr Cys
35

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> 骆驼(CAMELIDAE)

<400> 8

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Arg Tyr
1 5 10

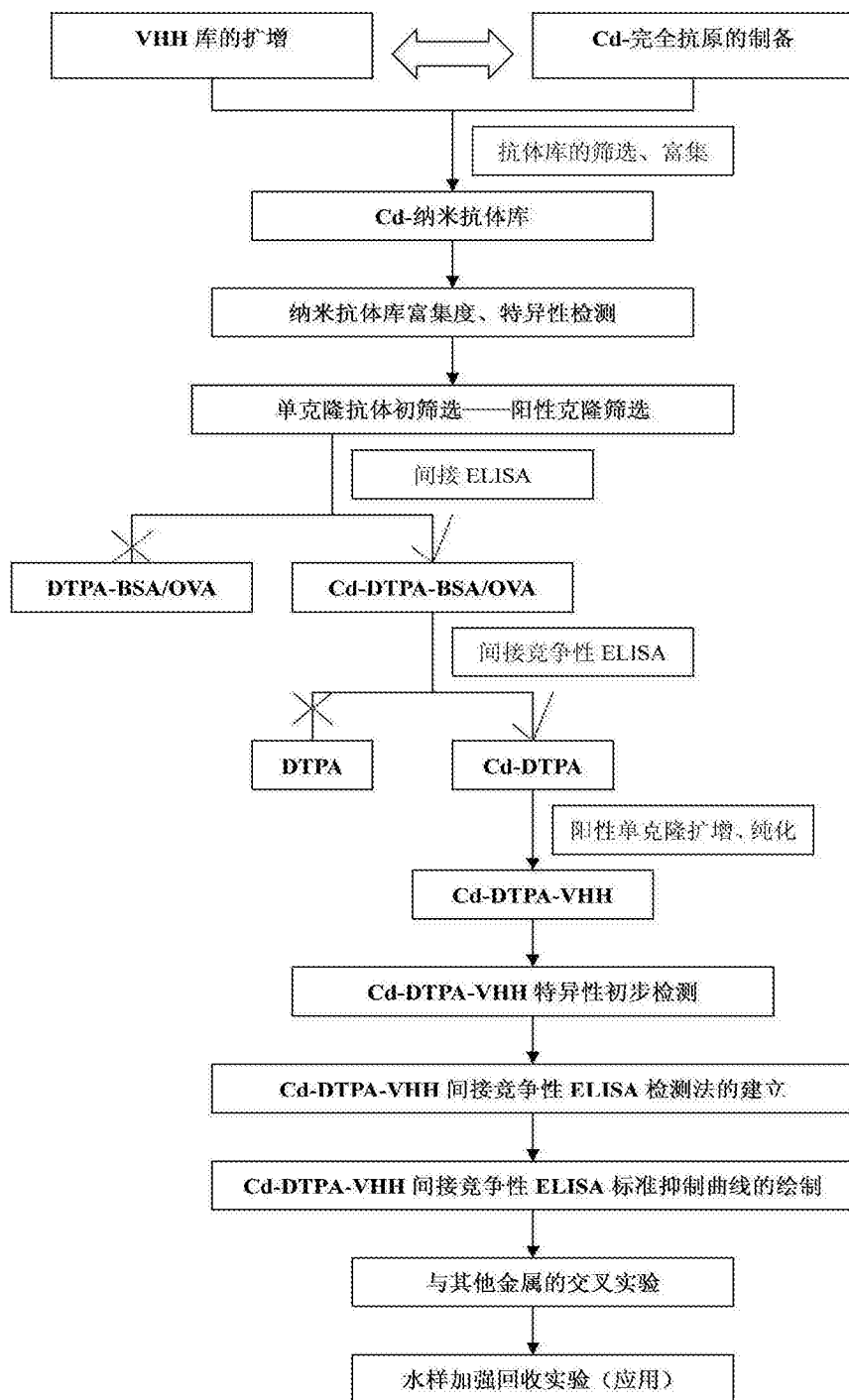


图 1

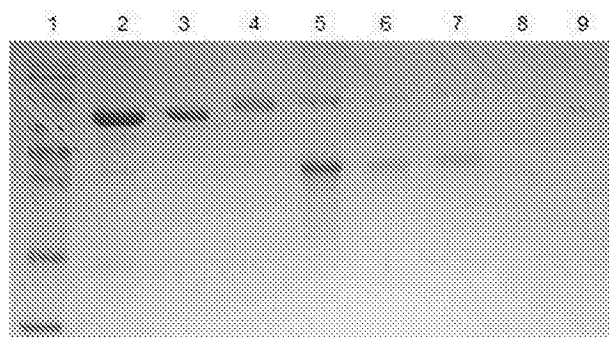


图 2

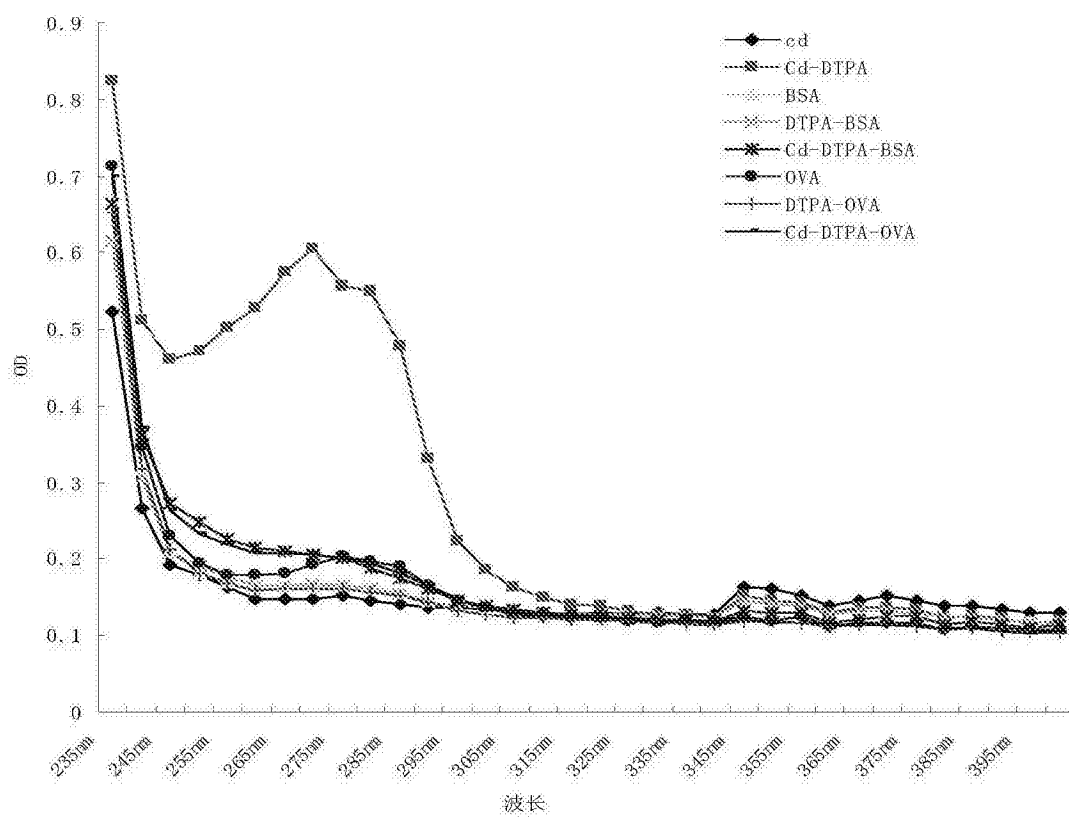


图 3

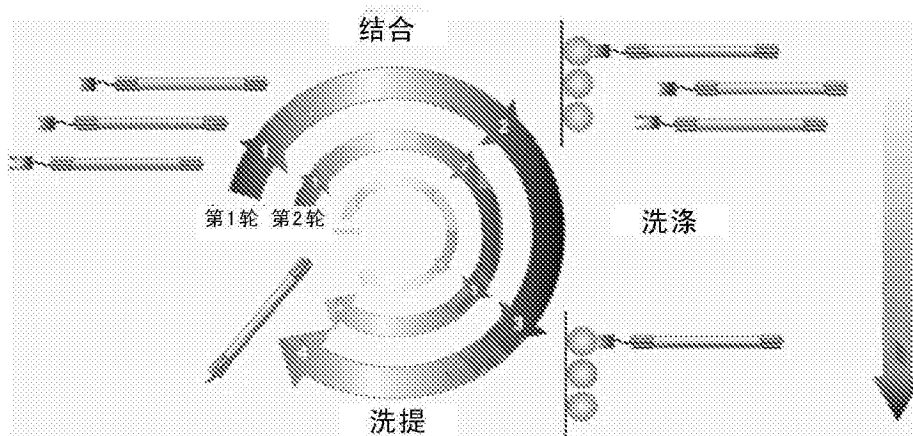


图 4

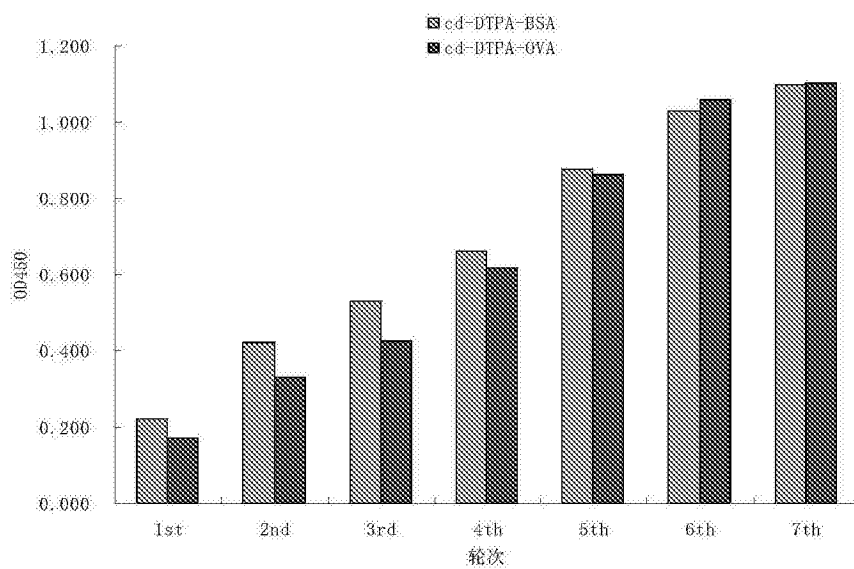


图 5

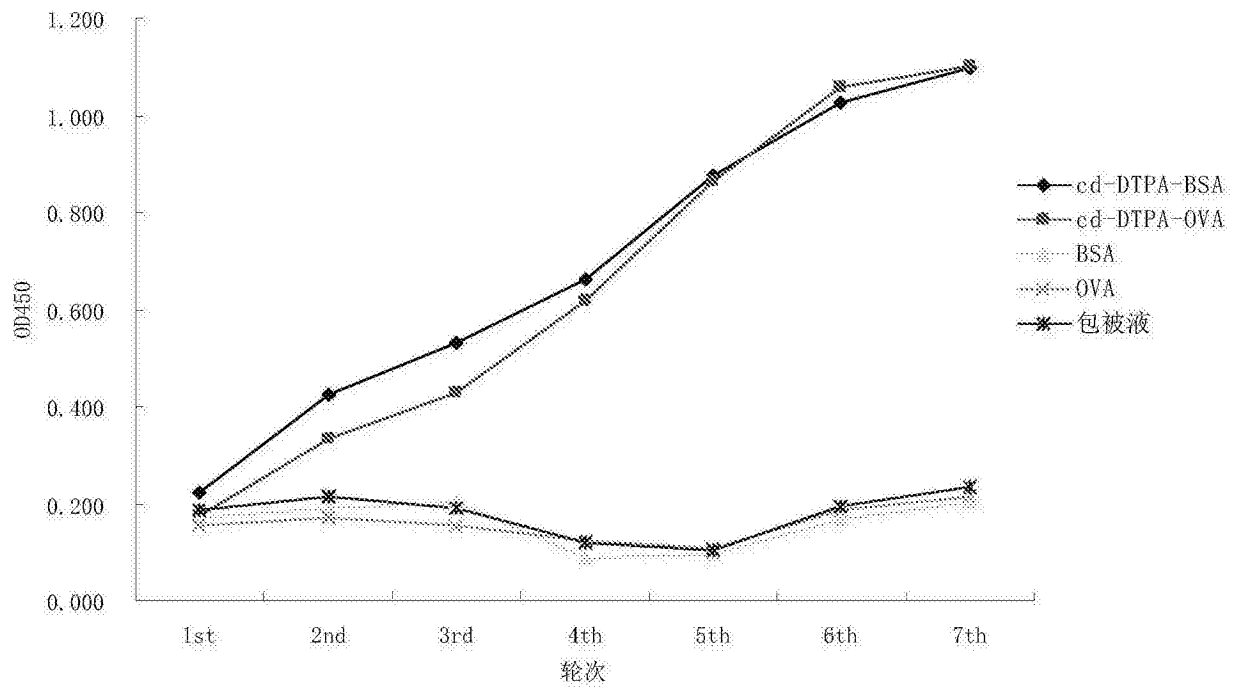


图 6

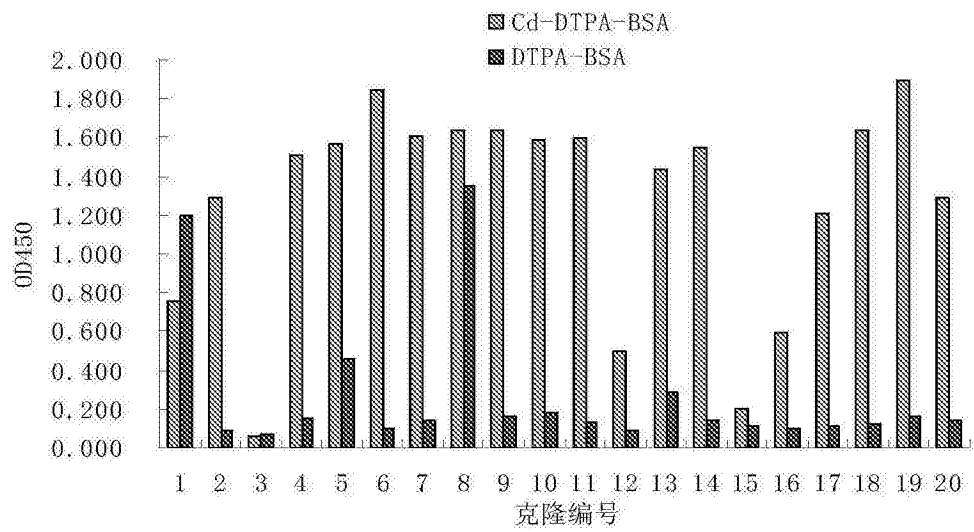


图 7

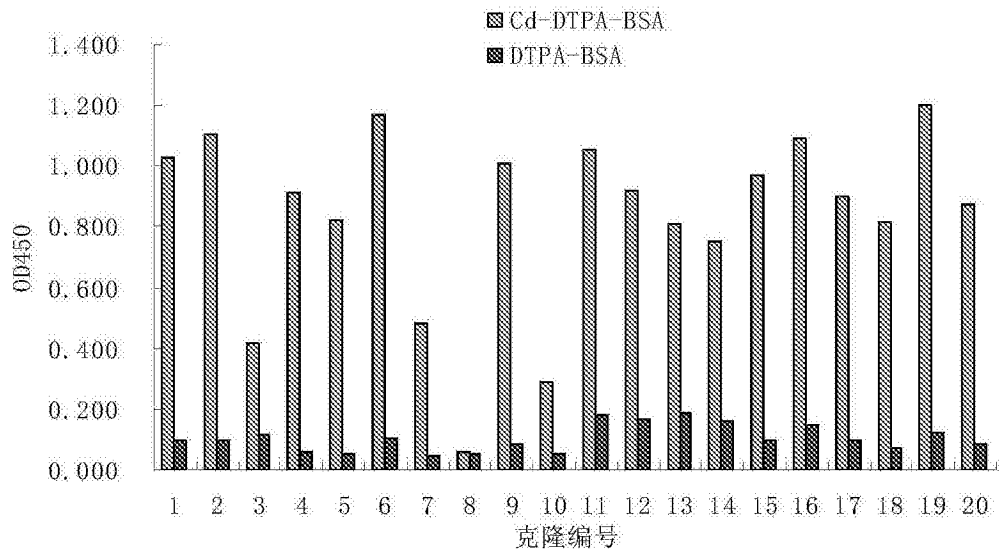


图 8

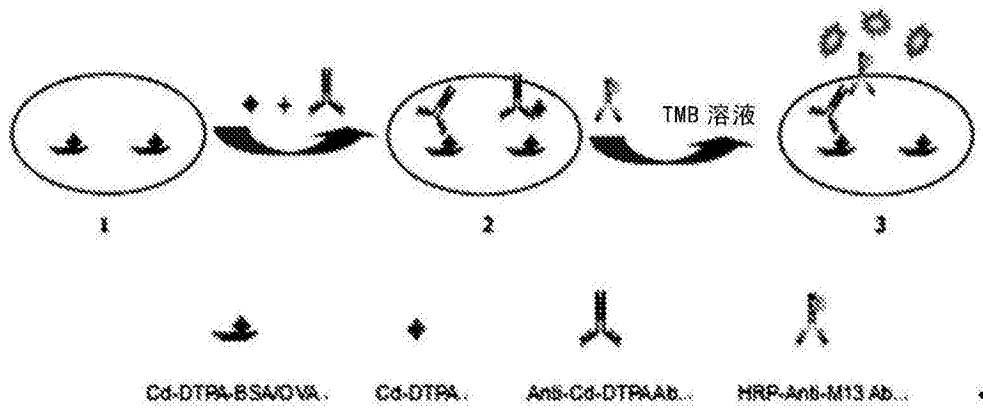


图 9

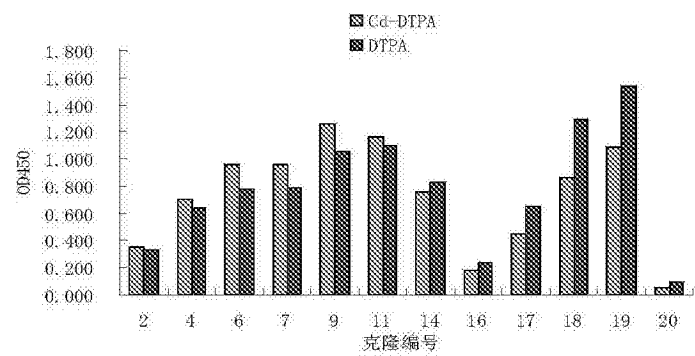


图 10

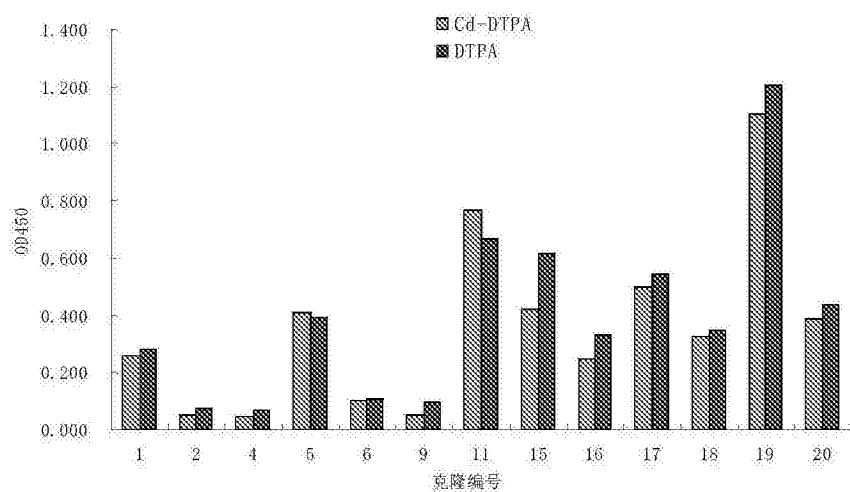


图 11

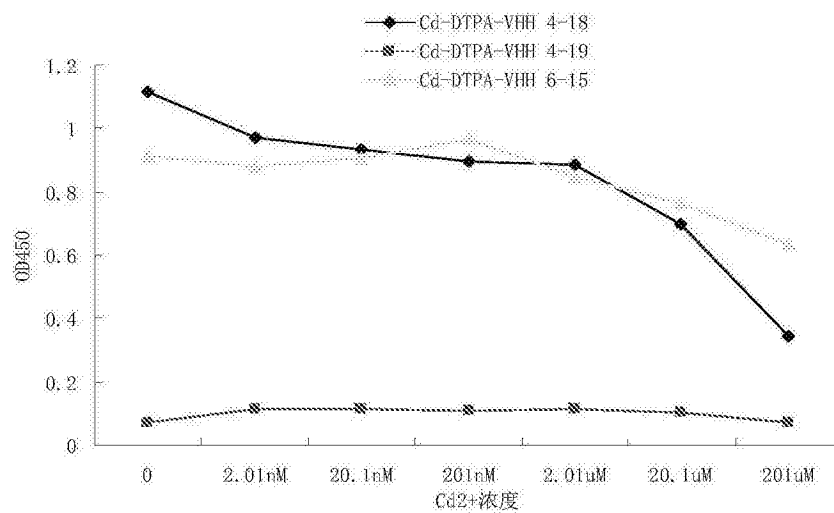


图 12

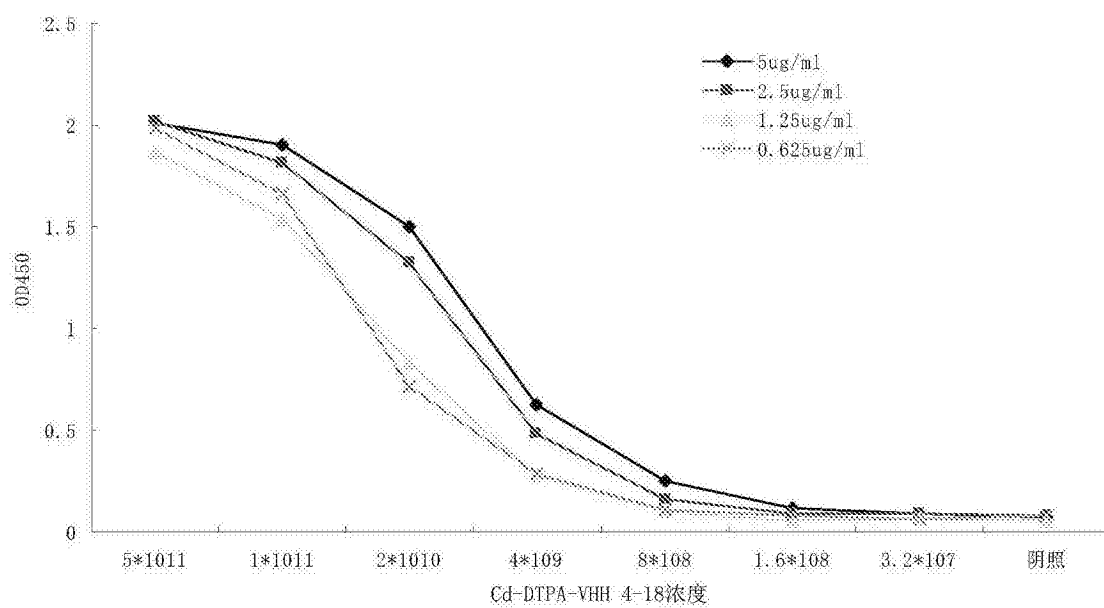


图 13

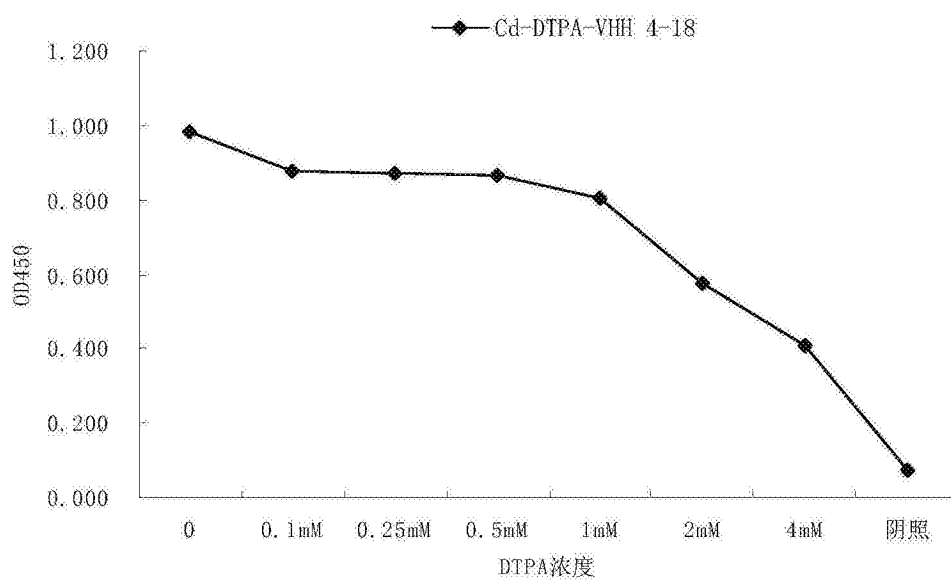


图 14

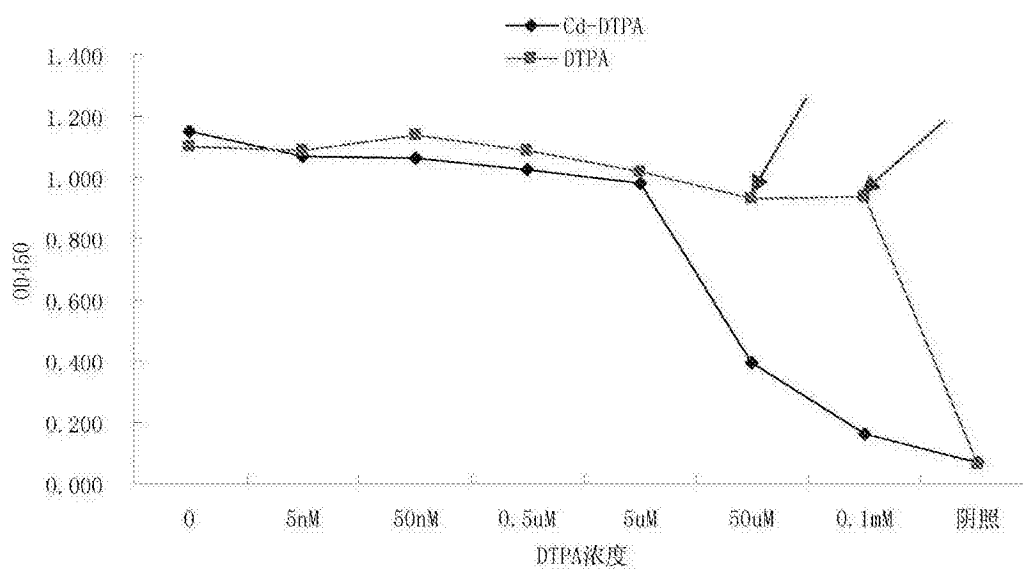


图 15

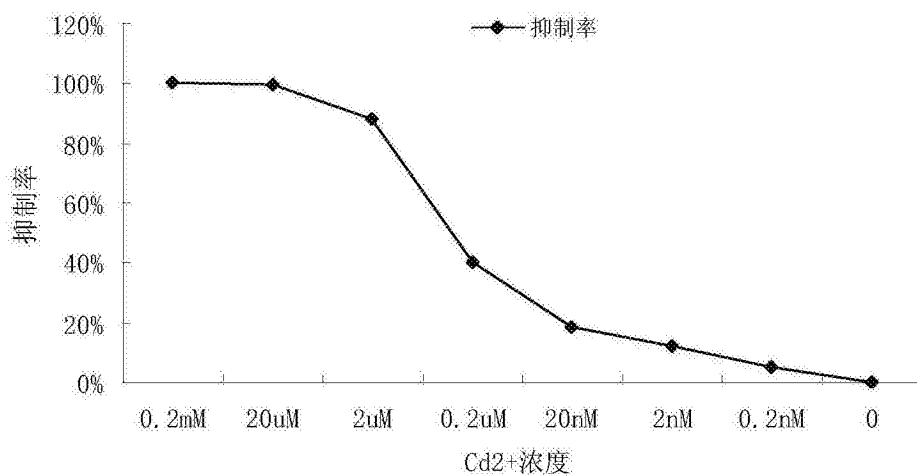


图 16

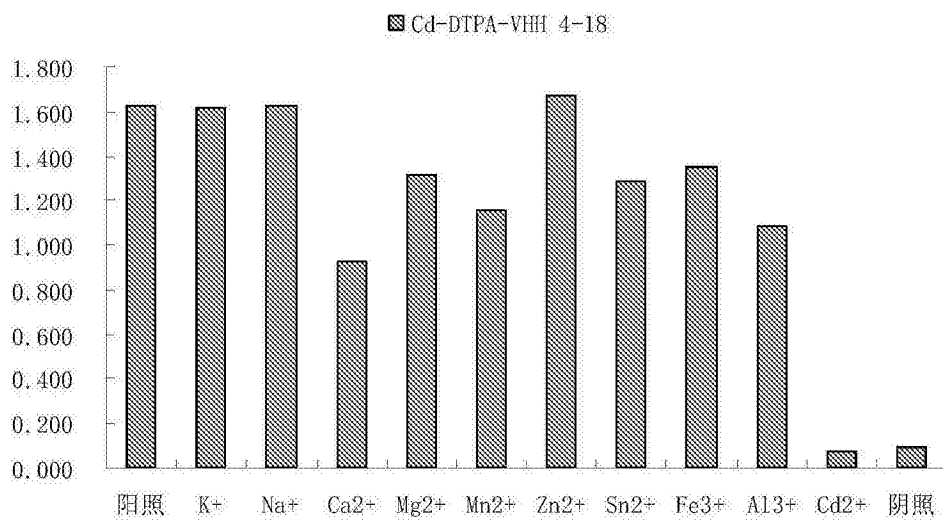


图 17

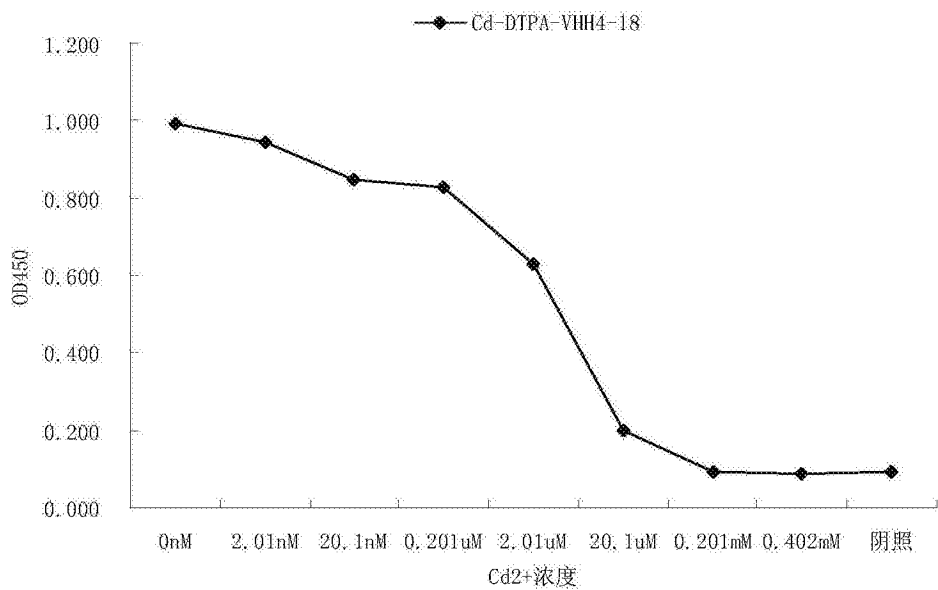


图 18

专利名称(译)	特异性识别重金属Cd的纳米抗体及其应用		
公开(公告)号	CN105622758A	公开(公告)日	2016-06-01
申请号	CN201410593859.8	申请日	2014-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
[标]发明人	姚刚 王娟 姜忍忍 依布拉音		
发明人	姚刚 王娟 姜忍忍 依布拉音		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/13 C12N7/01 G01N33/543 G01N33/53		
代理人(译)	陈静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及特异性识别重金属Cd的纳米抗体及其应用。揭示了针对重金属Cd的纳米抗体，所述的纳米抗体对于重金属Cd具有良好的特异性，与其它金属的交叉反应性很低。本发明的纳米抗体可灵敏检测重金属Cd，重复性好，结果稳定。利用所述的纳米抗体，可制备方便、快速且准确地检测重金属Cd的试剂盒。

MAEVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCTVSGYTLKNYYAIGWFRQVPGKER

FR1

CDR1

FR2

EGVSCFSRRVGSPPFYADSVKGRFTISRDDAANTVYLMNSLNR

CDR2

FR3