



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107576786 A

(43)申请公布日 2018.01.12

(21)申请号 201710939895.9

(22)申请日 2017.09.30

(71)申请人 深圳市绿诗源生物技术有限公司

地址 518000 广东省深圳市大鹏新区大鹏
办事处布新社区布新村工业大道2号D
栋101.201.301

(72)发明人 宁波 蒋永青 黄斌 刘海森
朱永利 胡雄峰

(74)专利代理机构 北京科家知识产权代理事务
所(普通合伙) 11427

代理人 陈娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表5页

(54)发明名称

一种用于检测氯霉素的复合物及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测氯霉素的复合物及其制备方法,该复合物能成倍提高氯霉素ELISA检测试剂盒或氯霉素化学发光酶免疫检测试剂盒在检测食品样本中残留氯霉素的灵敏度;同时也可提高氯霉素ELISA检测试剂盒或氯霉素化学发光酶免疫检测试剂盒的生产稳定性和降低生产成本;其技术要点是:为生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶-链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物产品。

1. 一种用于检测氯霉素的复合物, 其特征在于, 所述的复合物为生物素化抗氯霉素 Fab-碱性磷酸酶-链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物产品。

2. 根据权利要求1所述的一种用于检测氯霉素的复合物, 其特征在于, 所述的生物素化抗氯霉素 Fab-碱性磷酸酶融合蛋白是轻链融合蛋白基因和重链融合蛋白基因由链间二硫键联结所得的; 所述的轻链融合蛋白基因氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示; 所述的重链融合蛋白基因氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 根据权利要求1所述的一种用于检测氯霉素的复合物, 其特征在于, 所述的轻链融合蛋白基因是由抗氯霉素单抗的轻链可变区VL, 轻链恒定区Ck, 生物素受体肽和生物素组成的; 所述的轻链可变区DNA序列如SEQ ID NO.3所示; 所述的生物素受体肽DNA序列如SEQ ID NO.4所示; 所述的恒定区DNA序列如SEQ ID NO.5所示。

4. 根据权利要求1所述的一种用于检测氯霉素的复合物, 其特征在于, 所述的重链融合蛋白基因是由抗氯霉素单抗的重链可变区VH, 重链恒定区CH1和碱性磷酸酶组成, 所述的重链可变区VH的DNA序列如SEQ ID NO.6所示; 所述的重链恒定区CH1的DNA序列如SEQ ID NO.7所示。

5. 制备权利要求所述的一种用于检测氯霉素的复合物的方法, 其特征在于, 依次包括下述步骤:

1) 将抗氯霉素单抗的轻链VL-Ck基因DNA序列与生物素受体肽DNA序列拼接形成完整的轻链融合蛋白基因;

2) 将抗氯霉素单抗的重链VH-CH1基因DNA序列与E. coli 碱性磷酸酶基因DNA序列和6xHis标签DNA序列拼接成完整的重链融合蛋白基因;

3) 分别将步骤1) 制备的轻链融合蛋白基因密码子和步骤2) 制备的重链融合蛋白基因密码子优化, 顺序拼接合成, 插入到pET30a, 构建成E. coli 表达质粒pET30aCAPAp;

4) 先用BirA表达质粒pBIG-5b预转化, 再用pET30aCAPAp转化带有BirA基因的E. coli BL21 (DE3) 菌株, 经过培养和诱导表达制得生物素化抗氯霉素 Fab-碱性磷酸酶融合蛋白;

5) 将步骤4) 制备的生物素化抗氯霉素 Fab-碱性磷酸酶, 按克分子比与商品化的链霉亲和素-碱性磷酸酶等量混合, 用分子筛层析柱分离纯化, 即可制备得到生物素化抗氯霉素 Fab-碱性磷酸酶-链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物产品。

一种用于检测氯霉素的复合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明公开了一种复合物及其制备方法,具体地说,是一种用于检测氯霉素的复合物及其制备方法。

背景技术

[0002] 氯霉素(Chloramphenicol, CAP)是一种应用广泛的抗生素。但氯霉素对骨髓和肝脏有严重的毒副作用,能抑制骨髓细胞和肝细胞线粒体的蛋白质合成,而引起人的再生性障碍性贫血,粒细胞缺乏症,新生儿、早产儿灰婴综合症等疾病。目前,世界上欧美等发达国家已相继禁止或严格禁止使用。2002年12月中国农业部公告第235号文规定,氯霉素在所有食品动物的所有可食组织中不得检出。但由于氯霉素价格便宜且为广谱抗生素,违法使用仍很普遍。因此加强对动物性食品中氯霉素的残留检测是非常必要的。常用于氯霉素残留检测的方法除了有微生物法和仪器分析法外,免疫学检测法如ELISA或化学发光酶免疫分析技术灵敏度比微生物法高,样品前处理又比仪器分析法简单,适于现场监控和大量样本筛查。

[0003] 目前,用于免疫学检测的抗体都是单克隆抗体或多克隆抗体。基因工程抗体如单链抗体(scFv)、单域抗体(VHH)和Fab片段抗体在小分子检测中的应用,给用于免疫检测的抗体提供了新的选择。特别是一些新型抗体,如抗体片段与酶或荧光蛋白的融合蛋白和双特异性抗体等,具备传统抗体所没有的一些功能和优点。同时在制备生产方面比传统抗体的制备生产成本更低,更适合大批量生产制备,这对保证检测试剂盒质量稳定性更为有利。

[0004] 现有的专利文献或非专利文献记载的碱性磷酸酶与抗体融合蛋白,主要是单链抗体(ScFv)与AP融合蛋白的构建,如:CN103555732A, CN103014012A, CN105177016A;单域抗体与AP融合蛋白的构建;也有Fab与AP融合蛋白的构建。

[0005] 由于单链抗体通常比原亲本完整抗体亲和性大为降低,应用受到限制。Fab-碱性磷酸酶融合蛋白的抗体亲和性通常与亲本抗体保持一致,有很好的应用前景。但在检测灵敏度要求更高的情况下,需要新型的抗体-碱性磷酸酶融合蛋白的设计和制备。在一个抗体分子上标记多个酶分子或形成大的抗体-酶复合物,是实践证明行之有效的方案。如ABC(亲和素-生物素复合物)法,聚合物-酶复合物法(DAKO EnVision和迈新MaxVision)等,都是通过在一个抗体分子上连接多个酶分子来达到放大显色反应,从而提高检测灵敏度。

[0006] 生物素与亲和素(avidin)和链霉亲和素(streptavidin)之间的结合,是已知的生物分子间亲和性最高($K_d \sim 10^{-14-15}M$)。生物素标记的抗体或抗原,与酶标记的亲和素或链霉亲和素组成的酶免疫放大系统是目前免疫生物检测技术中常用的高度敏感的系统。但体外生物素标记抗原或抗体是一个化学随机交联反应,交联位点和交联数量有随机性,导致方法的重复性和对抗原或抗体活性的影响难以确定。

发明内容

[0007] 针对上述现有技术不足,本发明的第一个目的是提供一种生物素化抗氯霉素Fab-

碱性磷酸酶融合蛋白和链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物,该复合物能成倍提高氯霉素ELISA检测试剂盒或氯霉素化学发光酶免疫检测试剂盒在检测食品样本中残留氯霉素的灵敏度;同时也可提高氯霉素ELISA检测试剂盒或氯霉素化学发光酶免疫检测试剂盒的生产稳定性和降低生产成本。

[0008] 本发明的第二个目的是提供上述生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶融合蛋白和链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物的制备方法。

[0009] 为此,本发明提供的第一个技术方案是这样的:

[0010] 一种用于检测氯霉素的复合物,所述的复合物为生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶-链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物产品。

[0011] 作为本发明的进一步优选,上述的一种用于检测氯霉素的复合物,所述的生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶融合蛋白是轻链融合蛋白基因和重链融合蛋白基因由链间二硫键联结所得的;所述的轻链融合蛋白基因氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述的重链融合蛋白基因氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0012] 作为本发明的进一步优选,上述的一种用于检测氯霉素的复合物,所述的轻链融合蛋白基因是由抗氯霉素单抗的轻链可变区VL,轻链恒定区Ck,生物素受体肽和生物素组成的;所述的轻链可变区DNA序列如SEQ ID NO.3所示;所述的生物素受体肽DNA序列如SEQ ID NO.4所示;所述的恒定区DNA序列如SEQ ID NO.5所示。

[0013] 作为本发明的进一步优选,上述的一种用于检测氯霉素的复合物,所述的重链融合蛋白基因是由抗氯霉素单抗的重链可变区VH,重链恒定区CH1和碱性磷酸酶组成,所述的重链可变区VH的DNA序列如SEQ ID NO.6所示;所述的重链恒定区CH1的DNA序列如SEQ ID NO.7所示。

[0014] 本发明提供的第二个技术方案是这样的:

[0015] 一种用于检测氯霉素的复合物的制备方法,依次包括下述步骤:

[0016] 1) 将抗氯霉素单抗的轻链VL-Ck基因DNA序列与生物素受体肽DNA序列拼接形成完整的轻链融合蛋白基因;

[0017] 2) 将抗氯霉素单抗的重链VH-CH1基因DNA序列与E.coIi碱性磷酸酶基因DNA序列和6xHis标签DNA序列拼接成完整的重链融合蛋白基因;

[0018] 3) 分别将步骤1) 制备的轻链融合蛋白基因密码子和步骤2) 制备的重链融合蛋白基因密码子优化,顺序拼接合成,插入到pET30a,构建成E.coIi表达质粒pET30aCAPAp;

[0019] 4) 先用BirA表达质粒pBIG-5b预转化,再用pET30aCAPAp转化带有BirA基因的E.coIi BL21 (DE3) 菌株,经过培养和诱导表达制得生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶融合蛋白;

[0020] 5) 将步骤4) 制备的生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶,按克分子比与商品化的链霉亲和素-碱性磷酸酶等量混合,用分子筛层析柱分离纯化,即可制备得到生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶-链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物产品。

[0021] 与现有技术相比,本发明提供的生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶融合蛋白和链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物可用于制备高灵敏度的氯霉素ELISA检测试剂盒或氯霉素化学发光酶免疫检测试剂盒,其优点在于可成倍提高氯霉素ELISA检测试剂盒或氯霉素化学发光酶免疫检测试剂盒在检测食品样本中残留氯霉素的灵敏度;同时也可提高氯霉素

ELISA检测试剂盒或氯霉素化学发光酶免疫检测试剂盒的生产稳定性和降低生产成本。

具体实施方式

[0022] 为了使本发明的目的、技术方案和有益技术效果更加清晰,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解的是,本说明书中描述的实施例仅仅是为了解释本发明,并非为了限定本发明,实施例的参数、比例等可因地制宜做出选择而对结果并无实质性影响。

[0023] 需要说明的是,本发明所采用的原料,除特殊说明外,均通过常规手段制备或者通过商业渠道购买。

[0024] 实施例1

[0025] 一、生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶融合蛋白基因合成和表达质粒pET30aCAPAp构建:

[0026] (1)将轻链可变区(VL)和已知的小鼠轻链恒定区C Kappa基因DNA序列(GenBank: BC094013.1)与生物素受体肽(GLNDIFEAQKIEWHE)DNA序列拼接形成完整的轻链融合蛋白基因;所述的轻链融合蛋白基因氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述的轻链可变区DNA序列如SEQ ID NO.3所示;所述的生物素受体肽DNA序列如SEQ ID NO.4所示;所述的恒定区DNA序列如SEQ ID NO.5所示。

[0027] (2)将抗氯霉素单抗的重链可变区(VH)和已知的小鼠重链CH1基因DNA序列(GenBank),与E.coli碱性磷酸酶基因DNA序列(E.coli碱性磷酸酶基因DNA序列:GenBank: X04586.1)和6xHis标签DNA序列拼接成完整的重链融合蛋白基因;所述的重链融合蛋白基因氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示;述的重链可变区VH的DNA序列如SEQ ID NO.6所示;所述的重链恒定区CH1的DNA序列如SEQ ID NO.7所示。

[0028] (3)然后将步骤1)和步骤2)轻链融合蛋白基因和重链融合蛋白基因基因密码子优化,按轻链融合蛋白基因位于第一读码框架,重链融合蛋白基因位于第二读码框架顺序拼接合成生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶融合蛋白基因。

[0029] (4)生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶融合蛋白基因并插入到pET30a载体,构建成E.coli表达质粒pET30aCAPAp,合成的基因序列以及插入载体的位置通过DAN测序证实正确无误。

[0030] 设计好的生物素化,其方法与CN104212791A表达的方法一致。

[0031] 二、生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶融合蛋白的表达纯化制备

[0032] 1)大肠杆菌DE21菌株用BirA表达质粒pBIG-5b预转化,氨苄青霉素抗性筛选转化阳性菌落。随机挑选10个阳性菌落,扩增培养提取质粒,用NotI和XhoI双酶切鉴定。挑选鉴定正确的菌落扩增培养,制备电转化感受态菌。

[0033] 2)表达质粒pET30aCAPAp的制备:用pET30aCAPAp电转化BirA表达的DL21菌,卡那霉素和氨苄青霉素双抗性筛选阳性转化克隆;随机挑选10个菌落,扩增培养提取质粒,挑选经DNA测序证实序列正确无误的菌落,扩增培养保存为pET30aCAPAp菌种。

[0034] 三、生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶融合蛋白的大规模培养纯化制备:从氨苄青霉素/卡那霉素平板挑选1-2个隔夜培养的pET30aCAPAp菌落,置于100mL TB培养基(含氨苄青霉素/卡那霉素)37℃ 200rpm摇床培养过夜。16小时培养后转入3L培养罐,37℃

200rpm继续培养至OD600达到0.8,加入终浓度0.8mM IPTG和10mM D生物素,25℃ 200rpm继续培养12小时。收集细菌:4℃ 5000rpm,菌体称重,按菌体湿重1:10 (g/ml)比例加入裂解缓冲液充分混悬菌体,超声裂解释放重组蛋白。裂解液4℃ 10,000rpm离心30分钟,收集上清液,0.45um膜滤清。Ni-NTA琼脂糖珠柱纯化生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶融合蛋白。

[0035] 四、生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶融合蛋白和链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物的制备:

[0036] 将表达纯化制备的生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶,按克分子比与商品化的链霉亲和素-碱性磷酸酶等量混合,结合形成生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶-链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物。然后用葡聚糖凝胶G200分子筛层析柱将生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶-链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物与未形成复合物的生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶,或链霉亲和素-碱性磷酸酶分离纯化,即可制备得到生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶-链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物产品。

[0037] 为了更好的说明本发明的技术效果,下面给出本发明提供的产品试验数据例:

[0038] 生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶融合蛋白和链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物、氯霉素单克隆抗体scFV-碱性磷酸酶融合蛋白的氯霉素抗体这三种抗体在ELISA上检测结果验证:

[0039] 一:生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶融合蛋白和链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物。

[0040] 下述验证例中的底物A液、底物B液、终止液、标准品、样品均按照本领域常规采用物质、计量单位和技术手段进行。

[0041] 反应模式:25℃、30-15min、50μL(标准品/样品)+50μL(复合物抗体)/50μL(底物A液)+50μL(底物B液)/50μL(终止液),检测结果数据见表1。

[0042] 表1

[0043]

Ag 浓度	256K	128K	64K	32K	16K	8K	4K	2K	1K
复合物浓度	1W	2W	3W	5W	8W	12W	16W	16W	16W
0ppb	2.127	2.141	3.095	4.431	4.429	3.508	2.928	2.365	2.17
0.01ppb	2.119	1.869	2.719	3.109	3.006	3.057	2.739	2.031	1.928
0.03ppb	1.839	1.698	2.358	2.87	2.829	2.981	2.81	2.146	1.899
0.09ppb	1.28	1.18	1.611	1.881	1.978	2.273	2.128	1.974	1.82
0.27ppb	0.57	0.527	0.781	0.973	1.196	1.38	1.346	1.556	1.522
0.81ppb	0.172	0.164	0.351	0.427	0.483	0.666	0.644	0.96	1.025
2.43ppb	0.043	0.041	0.096	0.144	0.225	0.27	0.328	0.476	0.461

[0044]

7. 29ppb	0. 022	0. 023	0. 039	0. 068	0. 073	0. 114	0. 112	0. 173	0. 239
线性	0. 9504	0. 9883	0. 9971	0. 985	0. 9757	0. 9866	0. 9589	0. 9199	0. 9426
IC50	0. 125	0. 108	0. 097	0. 065	0. 069	0. 169	0. 228	0. 541	0. 723
拐点	2	3	4	3	5	3	5	3	3
标 2 抑制	99. 6%	87. 3%	87. 9%	70. 2%	67. 9%	87. 1%	93. 5%	85. 9%	88. 8%
标 3 抑制	86. 5%	79. 3%	76. 2%	64. 8%	63. 9%	85. 0%	96. 0%	90. 7%	87. 5%
标 4 抑制	60. 2%	55. 1%	52. 1%	42. 5%	44. 7%	64. 8%	72. 7%	83. 5%	83. 9%
标 5 抑制	26. 8%	24. 6%	25. 2%	22. 0%	27. 0%	39. 3%	46. 0%	65. 8%	70. 1%
标 6 抑制	8. 1%	7. 7%	11. 3%	9. 6%	10. 9%	19. 0%	22. 0%	40. 6%	47. 2%
标 7 抑制	2. 0%	1. 9%	3. 1%	3. 2%	5. 1%	7. 7%	11. 2%	20. 1%	21. 2%
标 8 抑制	1. 0%	1. 2%	1. 4%	2. 2%	2. 4%	3. 7%	4. 1%	8. 5%	12. 4%

[0045] 二:氯霉素单克隆抗体

[0046] 反应模式:25℃、30-15min、50μL (标准品/样品)+50μL (酶标记物)+50μL (氯霉素单克隆抗体)/50μL (底物A液)+50μL (底物B液)/50μL (终止液),结果数据见表2。

[0047] 表2

[0048]

Ag 浓度	256K	128K	64K	32K	16K	8K	4K	2K	1K
Ab 浓度	2W	4W	8W	16W	16W	16W	16W	16W	16W
0ppb	1. 56	1. 879	2. 792	2. 565	3. 142	3. 139	2. 936	2. 89	2. 552
0. 01ppb	1. 618	1. 323	2. 676	2. 469	2. 767	2. 784	2. 718	2. 591	2. 244
0. 03ppb	1. 617	1. 602	2. 308	2. 221	2. 653	2. 673	2. 501	2. 294	2. 189
0. 09ppb	1. 478	1. 721	2. 099	1. 959	2. 294	2. 485	2. 437	2. 221	2. 178

[0049]

0.27ppb	1.118	0.74	0.702	1.321	1.597	1.835	1.99	1.917	1.954
---------	-------	------	-------	-------	-------	-------	------	-------	-------

0.81ppb	0.532	0.43	0.566	0.634	1.009	1.404	1.573	1.587	1.497
---------	-------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

2.43ppb	0.178	0.154	0.201	0.28	0.436	0.645	0.953	0.928	1.044
---------	-------	-------	-------	------	-------	-------	-------	-------	-------

7.29ppb	0.091	0.059	0.075	0.128	0.211	0.373	0.487	0.485	0.561
---------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

线性	0.789	0.9774	0.9963	0.985	0.975	0.9809	0.9649	0.9218	
----	-------	--------	--------	-------	-------	--------	--------	--------	--

IC50	0.484	0.214	0.156	0.286	0.283	0.556	0.994	1.1	1.4
------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-----	-----

拐点	2	5	6	4	5	5	5	5	4
----	---	---	---	---	---	---	---	---	---

标2抑制	103.7%	70.4%	95.8%	96.3%	88.1%	88.7%	92.6%	89.7%	87.9%
------	--------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

标3抑制	103.7%	85.3%	82.7%	86.6%	84.4%	85.2%	85.2%	79.4%	85.8%
------	--------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

标4抑制	94.7%	91.6%	75.2%	76.4%	73.0%	79.2%	83.0%	76.9%	85.3%
------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

标5抑制	71.7%	39.4%	25.1%	51.5%	50.8%	58.5%	67.8%	66.3%	76.6%
------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

标6抑制	34.1%	22.9%	20.3%	24.7%	32.1%	44.7%	53.6%	54.9%	58.7%
------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

标7抑制	11.4%	8.2%	7.2%	10.9%	13.9%	20.5%	32.5%	32.1%	40.9%
------	-------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

标8抑制	5.6%	4.5%	2.8%	5.2%	7.6%	13.4%	17.9%	18.7%	25.0%
------	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------

[0050] 三:cFV-碱性磷酸酶融合蛋白的氯霉素抗体

[0051] 反应模式:25℃、30-15min、50μL(标准品/样品)+50μL(融合蛋白抗体)/50μL(底物A液)+50μL(底物B液)/50μL(终止液),结果数据见表3。

[0052] 表3

	Ag 浓度	2K	1K
[0053]	融合蛋白抗体浓度	1W	2W
	0ppb	1.159	1.494

	0. 01ppb	1. 27	1. 565
	0. 03ppb	1. 197	1. 51
	0. 09ppb	1. 234	1. 418
	0. 27ppb	1. 04	1. 083
	0. 81ppb	0. 548	0. 429
	2. 43ppb	0. 163	0. 148
	7. 29ppb	0. 095	0. 066
	线性		
[0054]	IC50	0. 701	0. 466
	拐点	4	4
	标 2 抑制	109. 6%	104. 8%
	标 3 抑制	103. 3%	101. 1%
	标 4 抑制	106. 5%	94. 9%
	标 5 抑制	89. 7%	72. 5%
	标 6 抑制	47. 3%	28. 7%
	标 7 抑制	14. 1%	9. 9%
	标 8 抑制	7. 5%	4. 2%

[0055] 由于在抗体浓度(稀释倍数)相同的情况下,IC50和抑制率越低,则抗体的灵敏度越高;达到相同反应效果的抗体稀释倍数越大,即所需抗体的量越少,则越有利于节省成本;基因工程抗体复合物结构的稳定性高,利于生产和产品的保存。

[0056] 根据上述说明书的揭示和指导,本发明所属领域的技术人员还可以对上述实施方式进行适当的变更和修改。因此,本发明并不局限于上面揭示和描述的具体实施方式,对本发明的一些修改和变更也应当落入本发明的权利要求的保护范围内。此外,尽管本说明书中使用了一些特定的语只是为了方便说明,并不对本发明构成任何限制。

序列表

<110> 深圳市绿诗源生物技术有限公司

<120> 一种用于检测氯霉素的复合物及其制备方法

<160> 7

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 233

<212> PRT

<213> 未知(Unknown)

<400> 1

```

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu Gly
1           5           10           15
Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys Ala Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
          20           25           30
Ile Gly Trp Leu Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ser Phe Lys Gly Leu Ile
          35           40           45
Tyr His Gly Thr Ile Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr
          85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
          100          105          110
Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
          115          120          125
Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
          130          135          140
Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145          150          155          160
Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
          165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
          180          185          190
Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
          195          200          205
Phe Asn Arg Asn Glu Cys Gly Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe
210          215          220

```

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 225 230
 <210> 3
 <211> 694
 <212> PRT
 <213> 未知(Unknown)
 <400> 3
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asn Leu Asn Ser Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Thr Arg Asp Pro Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ala Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
 195 200 205
 Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Lys Leu Gly
 210 215 220
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Pro Glu Met Pro Val Leu Glu Asn
 225 230 235 240
 Arg Ala Ala Gln Gly Asn Ile Thr Ala Pro Gly Gly Ala Arg Arg Leu
 245 250 255

Thr Gly Asp Gln Thr Ala Ala Leu Arg Asn Ser Leu Ser Asp Lys Pro		
260	265	270
Ala Lys Asn Ile Ile Leu Leu Ile Gly Asp Gly Met Gly Asp Ser Glu		
275	280	285
Ile Thr Ala Ala Arg Asn Tyr Ala Glu Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys		
290	295	300
Gly Ile Asp Ala Leu Pro Leu Thr Gly Gln Tyr Thr His Tyr Ala Leu		
305	310	315
Asn Lys Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser		
325	330	335
Ala Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly		
340	345	350
Val Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro Thr Ile Leu Glu Met Ala Lys		
355	360	365
Ala Ala Gly Leu Ala Thr Gly Asn Val Ser Thr Ala Glu Leu Gln Gly		
370	375	380
Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His Val Thr Ser Arg Lys Cys Tyr		
385	390	395
Gly Pro Ser Ala Thr Ser Gln Lys Cys Pro Gly Asn Ala Leu Glu Lys		
405	410	415
Gly Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu Leu Asn Ala Arg Ala Asp		
420	425	430
Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala		
435	440	445
Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg Glu Glu Ala Glu Ala Arg Gly		
450	455	460
Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala		
465	470	475
Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro		
485	490	495
Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys		
500	505	510
Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro		
515	520	525
Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala Ile Glu Leu Leu Ser Lys Asn		
530	535	540
Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln		
545	550	555
Asn His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu		

565	570	575
Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn		
580	585	590
Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile Val		
595	600	605
Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys		
610	615	620
Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser		
625	630	635
Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His		
645	650	655
Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr		
660	665	670
Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Glu		
675	680	685
His His His His His His		
690		

<210> 3

<211> 375

<212> DNA

<213> 未知(Unknown)

<400> 3

gctgacgctg ctccgaccgt ttctatcttc ccgccgtctt ctgaacagct gacctctggt 60
 ggtgcttctg ttgtttgctt cctgaacaac ttctaccga aagacatcaa cgtaaagtgg 120
 aaaatcgacg gttctgaacg tcagaacggt gttctgaact cttggaccga ccaggactct 180
 aaagactcta cctactctat gtcttctacc ctgaccctga ccaaagacga atacgaacgt 240
 cacaactctt acacctgcga agctaccac aaaacctcta cctctccgat cgtaaagtct 300
 ttcaaccgta acgaatgcgg tggttctggt ggtctgaacg acatcttcga agctcagaaa 360
 atcgaatggc acgaa 375

<210> 4

<211> 45

<212> DNA

<213> 未知(Unknown)

<400> 4

ggtctgaacg acatcttcga agctcagaaa atcgaatggc acgaa 45

<210> 5

<211> 342

<212> DNA

<213> 未知(Unknown)

<400> 5

gaagttcagc tgcaggaatc tgggtgctgaa ctggttaaac cgggtgcttc tggttaaactg 60
tcttgcaagg cttctgggta caccttcacc acctactgga ttcactgggt taaacagcgt 120
ccgggtcagg gtctggaatg gatcggtaac atcaacctga actctggtaa aaccaactac 180
aacgaaaaat tcaaaaacaa agctaccctg accgttgaca cctctttctac caccgcttac 240
atgcacctgt cttctctgac ctctgaagac tctgctgttt accactgcac ccgtgacccg 300
ggtaactact ggggtcaggg taccaccgtt accgtttcgg cc 342

<210> 6

<211> 351

<212> DNA

<213> 未知(Unknown)

<400> 6

tcggggggccg agctcgctaa aaccaccccg ccgtctgttt acccgctggc tccgggttct 60
gctgctcaga ccaactctat gggtaccctg gggtgcctgg ttaaagggtta ctccccggaa 120
ccggttaccg ttacctggaa ctctgggttct ctgttctctg gtgttcacac ctccccggt 180
gttctgcagt ctgacctgta caccctgtct tcttctgtta ccgttcctgc ttctacctgg 240
ccgtctgaaa ccgttacctg caacgttget caccggctt cttctacca agttgacaaa 300
aaaatcggtc cgcgtgactg caagcttggg ggaggttctg gaggtggttc t 351

<210> 7

<211> 699

<212> DNA

<213> 未知(Unknown)

<400> 7

gacatcgaac tgaccagtc tccgtcttct atgtctgttt ctctgggtga caccgtttct 60
atcacctgcg ctgcttctca gggtatctct tctaactcg gttggctgcg tcagaaaccg 120
ggtcagtctt tcaaaggctt gatctaccac ggtaccatcc tggaagacgg tgttccgtct 180
cgtttctctg gttctgggtc tgggtgctgac tactctctga ccatctcttc tctggaagct 240
gaagacttcg ctgactacta ctgcgttcag ggtaccact tcccgtacac cttegggtgg 300
ggtaccaaac tggaaatcaa acgtgctgac gctgctccga ccgtttctat ctccccgccg 360
tcttctgaac agctgacctc tgggtggtgct tctgttgttt gtttctgaa caacttctac 420
ccgaaagaca tcaacgttaa atggaaaatc gacggttctg aacgtcagaa cgggtgttctg 480
aactcttgga ccgaccagga ctctaaagac tctacctact ctatgtcttc taccctgacc 540
ctgaccaaag acgaatacga acgtcacaac tcttacacct gcgaagctac ccacaaaacc 600
tctacctctc cgatcggtta atctttcaac cgtaacgaat gcggtggttc tgggtggtctg 660
aacgacatct tcgaagctca gaaaatcgaa tggcacgaa 699

专利名称(译)	一种用于检测氯霉素的复合物及其制备方法		
公开(公告)号	CN107576786A	公开(公告)日	2018-01-12
申请号	CN2017110939895.9	申请日	2017-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市绿诗源生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市绿诗源生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市绿诗源生物技术有限公司		
[标]发明人	宁波 蒋永青 黄斌 刘海森 朱永利 胡雄峰		
发明人	宁波 蒋永青 黄斌 刘海森 朱永利 胡雄峰		
IPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	陈娟		
其他公开文献	CN107576786B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测氯霉素的复合物及其制备方法，该复合物能成倍提高氯霉素ELISA检测试剂盒或氯霉素化学发光酶免疫检测试剂盒在检测食品样本中残留氯霉素的灵敏度；同时也可提高氯霉素ELISA检测试剂盒或氯霉素化学发光酶免疫检测试剂盒的生产稳定性和降低生产成本；其技术要点是：为生物素化抗氯霉素Fab-碱性磷酸酶-链霉亲和素-碱性磷酸酶复合物产品。