



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103965358 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201410160576. 4

(22) 申请日 2014. 04. 22

(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 李燕萍 许杨 熊亮 何庆华

(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 16/42* (2006. 01)

*C12N 15/13* (2006. 01)

*C12N 15/63* (2006. 01)

*G01N 33/53* (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页  
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

模拟桔青霉素抗原的纳米抗体及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,设计一种模拟桔青霉素抗原的纳米抗体,具有(a) SEQIDNO. :1 所示的氨基酸序列或将该序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有针对桔青霉素单克隆抗体或多克隆抗体结合活性的由(a)衍生的与(a)具有90%以上同源性的氨基酸序列。本发明纳米抗体能模拟模拟桔青霉素抗原,具有广阔的市场空间。

1. 模拟桔青霉素抗原的纳米抗体,其特征如(a)或(b)所述:(a)、具有 SEQ ID NO.:1 所示的氨基酸序列;或 (b)、将(a)中的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有针对桔青霉素单克隆抗体或多克隆抗体结合活性的由(a)衍生的与(a)具有 90% 以上同源性的氨基酸序列。

2. 编码权利要求 1 所述模拟桔青霉素抗原的纳米抗体的核苷酸。

3. 包含权利要求 2 所述核苷酸序列的载体。

4. 包含权利要求 3 所述的载体的宿主细胞。

5. 根据权利要求 1 所述纳米抗体的制备方法,其特征在于通过噬菌体扩增或基因工程重组表达的方式进行大量制备;所述噬菌体扩增是指将展示模拟桔青霉素抗原的纳米抗体的噬菌体,通过生物扩增的方式,大量繁殖展示有纳米抗体的噬菌体粒子;所述基因工程重组表达的方式是指将编码纳米抗体的基因,通过克隆至表达载体,以抗体蛋白的形式大量制备。

6. 权利要求 1 所述模拟桔青霉素抗原的纳米抗体在免疫学检测分析中的应用。

7. 根据权利要求 6 所述应用,其特征在于该纳米抗体以固相抗原或竞争抗原在免疫学检测分析中的应用。

## 模拟桔青霉素抗原的纳米抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本专利涉及生物技术领域,具体涉及模拟桔青霉素抗原的纳米抗体及其应用。

### 背景技术

[0002] 桔青霉素 (Citrinin, CIT),又称为桔霉素,是青霉属和曲霉属等真菌菌株产生的真菌毒素,广泛存在于多种食品及动物饲料中。CIT 污染也存在于传统红曲发酵产品,广泛用于食品着色及风味增强。同时因其发酵代谢产物有多种功能活性成分也用于保健食品中。毒理学研究表明 CIT 具有肾毒性、肝毒性和潜在的致畸性,且能引发肿瘤和诱发突变。严重危害人体和动物的健康。因此,对食品中 CIT 含量的检测监控十分必要。

[0003] 目前,常见的真菌毒素检测方法有高效液相色谱法、液质联用分析法、免疫分析法。高效液相色谱法等仪器分析法具有检测准确、重复性好等特点,但同时也有仪器价格昂贵、样品前处理过程繁琐、样本检测耗时长、不能同时检测多个样品等缺点,因而其使用受到极大的限制,不适于基层监控使用。酶联免疫吸附检测法以其高灵敏度、检测方便、成本低廉等优势广泛用于真菌毒素的初步检测。然而,在方法建立过程中,必须使用真菌毒素标准品作为竞争抗原和制备包被抗原,对检测人员的健康和环境造成极大的威胁。因此,采用抗独特型抗体及抗原模拟表位等技术可替代有害的毒素标准品,并已取得了一定的进展。噬菌体展示技术已广泛用于从天然抗体库或免疫抗体库中淘选得到特异抗体。该技术在研究未知蛋白空间结构表位,受体与配体结合位点、寻找高亲和力生物活性的配体分子及新型疫苗的开发等方面也得到广泛应用。

### 发明内容

[0004] 本发明通过对天然纳米抗体噬菌体展示库中,筛选得到能与抗桔青霉素单克隆抗体特异结合的纳米抗体,该抗体具有与天然 CIT 分子相似的反应特性,能替代毒性较强的 CIT 标准品,并可作为竞争抗原或固相包被抗原应用于 CIT 的免疫学检测。

[0005] 本发明以抗 CIT 单克隆抗体为靶分子,将其固相包被于酶标板上,加入噬菌体展示的天然驼源单域重链纳米抗体库,进行亲和淘选,获得了可以模拟桔青霉素抗原的纳米抗体。

[0006] 本发明模拟桔青霉素抗原的纳米抗体:

(a) 该抗体的氨基酸序列如下:

QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAGSGRTFNRYPMWFRQVPGKEREFVAEINWGSSTYYADSVKGRFTISRDN  
NAKNTVFLQMSSLKPEDTAVYYCAAGSPGRYDYWGQGTQVTVSS

上述纳米抗体的序列中,大写英文字母分别代表二十一种已知的天然 L-型氨基酸残基或其 D-型异构体的一种,即 A 代表丙氨酸残基,C 代表半胱氨酸残基,D 代表天冬氨酸残基,E 代表谷氨酸残基,F 代表苯丙氨酸残基,G 代表甘氨酸残基,I 代表异亮氨酸残基,K 代表赖氨酸残基,L 代表亮氨酸残基,M 代表蛋氨酸残基,N 代表天冬酰胺酸残基,P 代表脯氨酸残基,Q 代表谷氨酰胺残基,R 代表精氨酸残基,S 代表丝氨酸残基,T 代表苏氨酸残基,

V 代表缬氨酸残基, W 代表色氨酸残基, Y 代表酪氨酸残基。

[0007] (b)将(a)中的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有针对抗桔青霉素单克隆抗体结合活性的由(a)衍生的与(a)具有 90% 以上同源性的氨基酸序列。

[0008] 本发明还涉及所述模拟桔青霉素抗原的纳米抗体的核苷酸。

[0009] 以及, 包含所述核苷酸序列的载体, 包含所述的载体的宿主细胞。

[0010] 本发明提及的模拟桔青霉素抗原的纳米抗体可通过噬菌体扩增或基因工程重组表达的方式进行大量制备。噬菌体扩增是指将展示有模拟桔青霉素抗原的纳米抗体的噬菌体, 通过生物扩增的方式, 大量繁殖展示有该纳米抗体的噬菌体粒子。基因工程重组表达的方式是指将编码该抗体的基因, 通过克隆至表达载体上, 以蛋白的形式大量制备。

[0011] 本发明还涉及所述的该纳米抗体在免疫学检测分析中的应用。包括酶联免疫吸附检测、胶体金免疫层析、免疫斑点杂交等基于抗原-抗体特异性反应的免疫学分析检测方法。

[0012] 本发明模拟桔青霉素抗原的纳米抗体在应用时, 可通过噬菌体扩增获得的展示有该纳米抗体的噬菌体粒子直接用于分析检测, 也可以通过基因工程表达成蛋白作为包被抗原用于分析检测。当然, 也可作为 CIT 标准品的代替物来进行免疫学检测分析。

[0013] 还涉及该纳米抗体以固相抗原或竞争抗原在免疫学检测分析中的应用。

[0014] 前述该纳米抗体可替代具有较强毒性 CIT 标准品, 并作为固相包被抗原或竞争抗原应用于 CIT 的免疫学检测。该纳米抗体具有与天然 CIT 分子相似的免疫反应特性, 效果非常好。

[0015] 本发明的意义在于可替代毒性较强的 CIT 标准品, 并可作为竞争抗原或固相抗原应用于 CIT 的免疫学检测, 具有和天然 CIT 分子相似的免疫反应特异性。该方法成本低, 可多样品同时检测, 具有很高的应用价值。

## 附图说明

[0016] 图 1 为该纳米抗体以噬菌体展示形式作为竞争抗原时的间接竞争 ELISA 标准曲线。检测范围 1.50 - 45.94 ng/mL,  $IC_{50}$  为 11.55 ng/mL。

[0017] 图 2 为该纳米抗体以抗体蛋白形式作为固相包被抗原时的间接竞争 ELISA 标准曲线。检测范围 12.14-196.35 ng/mL,  $IC_{50}$  为 48.94 ng/mL。

## 具体实施方式

[0018] 本发明将通过以下实施例作进一步的说明。

[0019] 实施例 1. 抗桔青霉素单克隆抗体的制备

### (一) 免疫抗原的制备

桔青霉素为小分子半抗原不具备免疫源性, 但可以通过偶联大分子载体蛋白使其具有免疫源性。通过对桔青霉素结构分析, 其具有羟基、羧基和羰基三个基团, 都可通过适当的化学方法与蛋白质偶联。但羧基和羟基是其抗原决定簇中的重要基团, 若利用其作为连接基团与蛋白质连接将导致桔青霉素抗原性的改变, 不能引发机体产生针对桔青霉素分子的抗体。故采用甲醛加成法, 通过桔青霉素分子上的  $C_1$  位置的活泼氢制备桔青霉素人工抗

原。具体步骤如下:0.5 mg 桔青霉素溶解于 150  $\mu$ l 甲醇中,加入 100  $\mu$ l 37%的甲醛,滴入 5 mg 匙眼贝血蓝蛋白(KLH, pH 4.2) 溶液中,37  $^{\circ}$ C 反应 24 h,即得到桔青霉素人工抗原。同样与卵清蛋白(OVA) 反应得到的桔青霉素人工抗原作为检测抗原。反应结束后,置 0.01 M PBS 4 $^{\circ}$ C 透析 72h。

#### [0020] (二) 抗桔青霉素单克隆抗体的制备

BALB/c 小鼠经桔青霉素人工抗原免疫 4 次后,间隔四周,尾静脉注射人工抗原 0.05mg/只,3 天后,脾细胞在 50% PEG 融合剂作用下与对数期生长的 SP2/O 杂交瘤细胞融合。经 HAT 选择培养液培养 7d 后,换 HT 培养基培养,取杂交瘤细胞培养上清进行间接 ELISA 筛选阳性克隆,采用间接竞争 ELISA 筛选分泌抗桔青霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞。阳性细胞经有限稀释法亚克隆 3 次均为 100% 的阳性后,建立细胞系并冻存。并将杂交瘤细胞接种于提前注射降植烷的 BALB/c 小鼠腹腔,制备腹水,经辛酸-硫酸铵沉淀法纯化单抗。

#### [0021] (三) 抗桔青霉素单克隆抗体的鉴定

经上述实验,筛选到一株分泌抗桔青霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞株(4G6),3 次亚克隆后,全部克隆为阳克隆。采用小鼠单抗分型试纸条测定该单抗为 IgG<sub>2a</sub> 型。与其他 OTA、ZEN、AFB<sub>1</sub> 和 DON 等常见的真菌毒素基本无交叉反应。成功筛选得到抗桔青霉素单克隆抗体。

#### [0022] 实施例 2. 天然单域重链抗体噬菌体展示文库的构建及鉴定

##### (一) 天然单域重链抗体噬菌体展示文库的构建

从两只健康未免疫的羊驼白细胞中提取总 RNA。以 Oligo dT 反转录获得 cDNA,经半巢式 PCR 获得重链抗体的可变区编码基因。将噬菌粒载体 pHEN1 和 PCR 扩增得到的可变区编码基因分别用 *Sfi* I、*Not* I 双酶切后,用 T4 DNA 连接酶连接过夜,连接产物电转化至大肠杆菌 TG1 中,取 10  $\mu$ l 转化后菌液倍数稀释测定库容量。其余菌液涂布于含 100  $\mu$ g/mL 2 $\times$ YT 培养板上。用含 30% 甘油的 2 $\times$ YT 培养基刮下所有菌落。接种 10 倍库容量的活细胞于 5mL 的 2 $\times$ YT(含 2% 葡萄糖、100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素)培养基中,37 $^{\circ}$ C,220r/min 培养至 OD<sub>600nm</sub> 达 0.5,按感染复数 20:1 加入辅助噬菌体,37 $^{\circ}$ C、220r/min 培养 60min。将培养物在 1000 g 离心 10min,用 50mL 的 2 $\times$ YT(含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素和 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素)培养液重悬沉淀,30 $^{\circ}$ C、220r/min 过夜培养,8000g 离心取上清,PEG 法纯化噬菌体,即得到噬菌体展示抗体文库,取 10  $\mu$ l 测定滴度,其余分装于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

##### (二) 抗体噬菌体展示文库的鉴定

随机挑取 40 个克隆进行分析,利用载体上的通用引物(M13-R 和 pHEN-R) 进行 PCR 验证。其中有 35 个能扩增出 400-750bp 条带,提示文库的克隆效率约为 87%,因此该初级文库的实际库容为  $1.9 \times 10^7$  个。

#### [0024] 实施例 3. 模拟桔青霉素抗原纳米抗体的亲和淘选及其鉴定

##### (一) 纳米抗体的亲和淘选

用 10 mM PBS (pH 7.4) 稀释抗 CIT 单克隆抗体 4G6,并以终浓度 100  $\mu$ g/mL 包被于酶标板上,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第二天用 PBST (PBS 包含 0.1% Tween-20 (v/v)) 洗涤 10 次后,加入 300  $\mu$ l 封闭液(3% BSA-PBS)4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。1 小时后弃封闭液,用 PBST 洗涤 5 次,加入 100  $\mu$ l 制备的噬菌体展示抗体文库(用 PBS 稀释噬菌体至约  $1.0 \times 10^{11}$  c. f. u),37 $^{\circ}$ C 孵育反应 1 小时。弃去未结合的噬菌体,用 PBST 洗涤 10 次,结合上的噬菌体用 0.2 M

Glycine-HCl (pH 2.2) 洗脱,并立即用 15  $\mu$ l 1 M Tris-HCl (pH 9.1) 中和。取 10  $\mu$ l 洗脱噬菌体测定滴度,其余的用于感染 20mL 生长至对数前期的 *E. coli* TG1 菌株进行扩增。次日用 PEG/NaCl 沉淀纯化噬菌体,并测定扩增后噬菌体的滴度。噬菌体回收率按以下公式计算:回收率 = (洗脱噬菌体 / 投入噬菌体)  $\times$  100%。

[0025] 在随后三轮淘选过程中,包被的抗 CIT 单克隆抗体浓度分别为 75  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL, 并用 CIT 标品溶液替代酸洗脱液,进行竞争洗脱。洗脱噬菌体的扩增同上。

#### [0026] (二) 阳性噬菌体克隆的鉴定

从平板上随机挑取 30 个噬菌体克隆进行扩增。用 10 mM PBS (pH 7.4) 稀释抗 CIT 单克隆抗体, 10  $\mu$ g/mL 包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第二天用 PBST (10 mM PBS, 0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤 3 次后,用含有 4% 脱脂奶粉的 PBS 进行封闭, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。投入 100  $\mu$ l 扩增后的噬菌体克隆,以原始噬菌体库体作为阴性对照,噬菌体浓度梯度稀释, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。加入 1:5000 稀释 HRP 标记的抗 M13 噬菌体二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。然后用 TMB 底物显色,酶标仪 (Thermo Scientific, USA) 读取 450 nm 处的吸收值。选取 OD<sub>450</sub> 大于阴性对照 2 倍的噬菌体克隆为阳性克隆。

#### [0027] (三) 噬菌体竞争结合实验

用 10 mM PBS (pH 7.4) 稀释抗 CIT 单克隆抗体, 10  $\mu$ g/mL 包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第二天用 PBST (10 mM PBS, 0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤 3 次后,用含有 4% 脱脂奶粉的 PBS 封闭, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。投入 50  $\mu$ l 噬菌体和 50  $\mu$ l CIT (100ng/mL), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。加入 1:5000 稀释 HRP 标记的抗 M13 噬菌体二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 小时。然后用 TMB 底物显色,读取 OD<sub>450</sub>。能结合抗 CIT 单克隆抗体,且能被 CIT 标准品阻断的噬菌体 pHEN-X27, 鉴定为模拟桔青霉素抗原的阳性克隆。

#### [0028] 实施例 4. 编码模拟桔青霉素抗原的纳米抗体基因的测序及氨基酸序列的确定

将前述得到的阳性克隆 pHEN-X27 进行扩增,菌液送自南京金斯瑞测序公司测序。依据测序结果及密码子表可获得该纳米抗体的氨基酸序列为:QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAGSGRTFNRYPMWFRQVPGKEREFVAEINWSGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVFLQMSSSLKPEDTAVYYCAAGSPGRYDYWGQGTQVTVSS。

#### [0029] 实施例 5. 模拟桔青霉素抗原的纳米抗体的大量制备

##### (一) 以噬菌体扩增的方式制备

将展示有含有模拟桔青霉素抗原的纳米抗体阳性克隆子的 TG1 菌液加入至 20mL 2 $\times$ YT (含有氨苄青霉素) 液体培养基中,培养至对数生长期,加入辅助噬菌体进行救援。37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时后离心,用等体积培养基 2 $\times$ YT (含有氨苄青霉素和卡那霉素)重悬菌体后, 30 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜。次日离心后,取上清加入 1/5 体积的 PEG/NaCl, 4 $^{\circ}$ C 静置 2 小时。离心后,弃上清,加入 1mL PBS 重悬沉淀,即为噬菌体扩增液。

##### (二) 以纳米抗体蛋白的方式制备

从含有模拟桔青霉素抗原的纳米抗体阳性克隆子的 TG1 菌液提取质粒后,经 *Nco* I 和 *Not* I 双酶切后回收编码抗体的基因片段,然后亚克隆至表达载体 pET-25b (+) (Novagen 公司,加入 6 个组氨酸标签),电转化至 Rosetta (DE3) 感受态细胞中。涂布于 LB-A (含氨苄青霉素) 固体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,得到阳性克隆。

[0031] 将上述得到的阳性克隆子,从平板上挑单菌落接种于 5mL LB-AC (含氨苄青霉素

和氯霉素)液体培养基中,37℃培养过夜。将过夜培养物按 1% 接种量(v/v)接种于 50mL 的 LB-AC 培养基中,37℃,200r/min 振荡培养 1-2 小时,当培养物细菌浓度 OD<sub>600</sub> 达到 0.7-0.9 时,加入终浓度为 0.1 mM 的 IPTG 诱导,30℃振荡培养 6-8 小时。离心收集菌体沉淀,重悬于 1 mL PBS 溶液中,超声破碎后,离心取上清。经过 Ni 柱纯化后,得到较高纯度的纳米抗体蛋白。

#### [0032] 实施例 6. 模拟桔青霉素抗原的纳米抗体作为竞争抗原在 ELISA 中的应用

##### (一) 样品提取

取红曲液态发酵样品 2 mL,加入甲醇萃取后用 PBS 调至甲醇终浓度为 10%,样品待测。

##### [0033] (二) 包被及封闭

用 10 mM PBS (pH 7.4) 稀释抗 CIT 单克隆抗体,0.75 μg/mL 包被于 96 孔酶标板,4℃ 孵育过夜。次日用 PBST (10 mM PBS, 0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤 3 次后,用含有 4% 脱脂奶粉的 PBS 封闭,37℃ 孵育 1 小时后,再用 PBST 洗涤 3 次,4℃ 保存待用。

##### [0034] (三) 标准曲线的建立

取出经上述步骤处理的酶标板,每孔分别投入 50 μl 表面展示有纳米抗体的噬菌体和一系列不同浓度的 50 μl CIT 标准品,37℃ 孵育 1 小时。加入 1:5000 稀释 HRP 标记的抗 M13 噬菌体二抗,37℃ 孵育 0.5 小时。然后用 TMB 底物显色,读取 OD<sub>450</sub>。以 CIT 浓度对数为横坐标,结合率(加入 CIT 的孔的 OD<sub>450</sub>/未加入 CIT 孔的 OD<sub>450</sub>×100%)为纵坐标,结果显示标准曲线呈 S 型,线性相关性较好,检测范围 1.50 - 45.94 ng/mL, IC<sub>50</sub> 为 11.55 ng/mL (图 1)。

##### [0035] (四) 样品的检测

取出处理好的酶标板,每孔分别投入 50 μl 表面展示有纳米抗体的噬菌体和待测样品提取液,其余步骤同上述步骤。根据标准曲线,倒推出样品中 CIT 的含量。

#### [0036] 实施例 7. 模拟桔青霉素抗原的纳米抗体作为固相抗原在 ELISA 中的应用

##### (一) 样品提取

取红曲大米固体发酵样品 1g,加入 5mL 甲醇超声萃取 20 min 后,静置 30min,将上清液转入具塞试管中。残渣再加 5mL 甲醇超声萃取,共萃取 3 次,合并上清液。取适量用 PBS 调至甲醇终浓度为 10% 后待测。

##### [0037] (二) 包被及封闭

用 10 mM PBS (pH 7.4) 稀释抗纳米抗体至终浓度 1.8 μg/mL,取 100μl 包被于 96 孔酶标板,4℃ 孵育过夜。次日用 PBST (10 mM PBS, 0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤 3 次后,用含有 4% 脱脂奶粉的 PBS 封闭,37℃ 孵育 1 小时后,再用 PBST 洗涤 3 次,4℃ 保存待用。

##### [0038] (三) 标准曲线的建立

取出经上述步骤处理的酶标板,每孔分别投入 50 μl 浓度为 3.5 μg/mL 抗 CIT 单克隆抗体和一系列不同浓度的 50 μl CIT 标准品,37℃ 孵育 1 小时。加入 1:2000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗,37℃ 孵育 0.5 小时。然后用 TMB 底物显色,读取 OD<sub>450</sub>。以 CIT 浓度对数为横坐标,结合率(加入 CIT 的孔的 OD<sub>450</sub>/未加入 CIT 孔的 OD<sub>450</sub>×100%)为纵坐标,结果也显示标准曲线呈 S 型,线性相关性较好,检测范围 12.14-196.35 ng/mL, IC<sub>50</sub> 为 48.94 ng/mL (图 2)。

##### [0039] (四) 样品的检测

取出处理好的酶标板,每孔分别投入 50  $\mu$ l 浓度为 3.5 $\mu$ g/mL 抗 CIT 单克隆抗体和待测样品提取液,其余步骤同上述步骤。根据标准曲线,倒推出样品中 CIT 的含量。

[0040] 实施例 7:易错 PCR 法对模拟桔青霉素抗原的纳米抗体进行改造

以噬菌粒 pHEN-X27 作为模板,易错 PCR 向 X27 的 DNA 序列片段中随机引入突变,上游引物 F:5' -TCG CGG CCC AGC CGG CCA TGG CCC AGT TGC AGC TG -3', 下游引物 R:5' -CGA GTG CGG CCG CTT GTG GTT TTG GTG TCT TGG G- 3'。50  $\mu$  L 易错 PCR 体系如下:5  $\mu$  L 10 $\times$  易错 PCR 缓冲液(500 mmol/L KCl, 70 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 0.1%(W/V, 明胶));0.5 mmol/L dATP/dGTP, 2.5 mmol/L dCTP/dTTP; 引物 F/R 各 40 pmol ;MgCl<sub>2</sub> 7 mmol/L ;MnCl<sub>2</sub> 0.3 mmol/L ;Taq DNA 聚合酶 2.5 U, ddH<sub>2</sub>O 补至 50  $\mu$  L。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$  C, 3 min ;94 $^{\circ}$  C 1 min, 59 $^{\circ}$  C 1 min, 72 $^{\circ}$  C 2 min, 30 个循环 ;72 $^{\circ}$  C 10 min。易错 PCR 扩增产物经 DNA 纯化试剂盒纯化后,用限制性内切酶 *Sfi*I 和 *Not*I 对扩增产物和噬菌粒 pHEN1 进行酶切,酶切产物经凝胶纯化试剂盒纯化后进行连接,转化至大肠杆菌 TG1 感受态细胞,涂布 LBA 平板,37 $^{\circ}$  C 过夜培养。将获得的转化子用辅助噬菌体 KM13 进行救援,得到展示突变的 X27 片段的噬菌体展示突变文库。

[0041] 采用应用实例 3 中的亲和淘选和鉴定的方法,获取具有与原始单域重链抗体 X27 同样性质(即与天然桔青霉素分子相似的反应特性,能与抗桔青霉素单克隆抗体或多克隆抗体结合)的突变体,这些突变体的氨基酸序列具有与抗桔青霉素单克隆抗体或多克隆抗体结合活性,由(a)衍生的与(a)具有 90% 以上同源性。

## SEQUENCE LISTING

<110> 南昌大学

<120> 模拟桔青霉素抗原的纳米抗体及其应用

<130> 2014

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Arg Thr Phe Asn Arg Tyr  
                  20                   25                   30

Pro Met Ser Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
                  35                   40                   45

Ala Glu Ile Asn Trp Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                  50                   55                   60

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



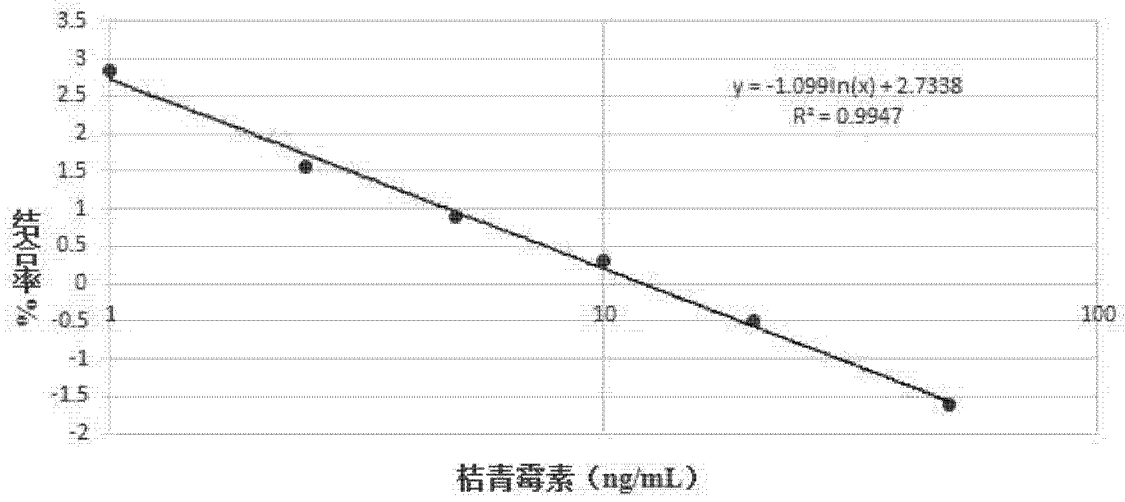


图 1

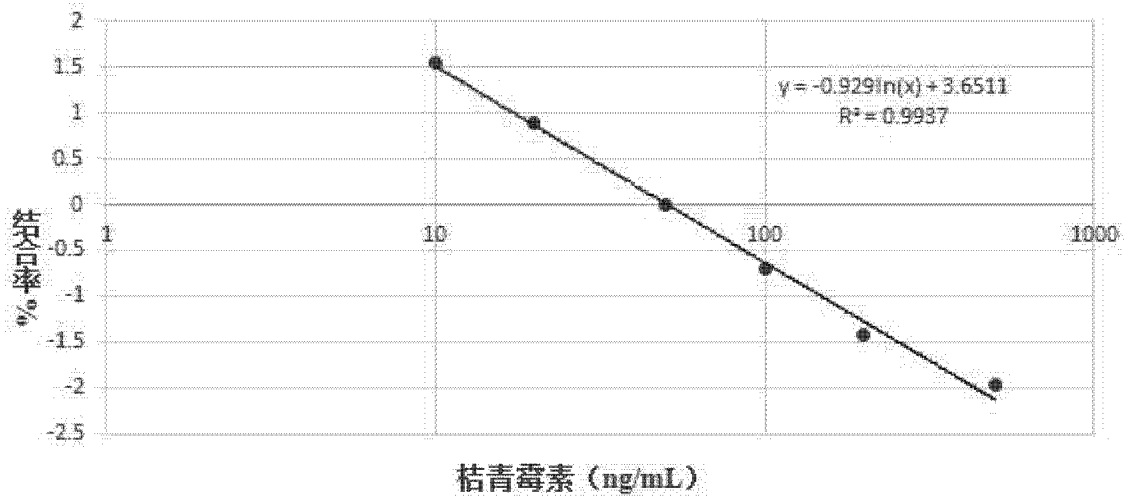


图 2

专利名称(译)	模拟桔青霉素抗原的纳米抗体及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103965358A</a>	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	CN201410160576.4	申请日	2014-04-22
[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	李燕萍 许杨 熊亮 何庆华		
发明人	李燕萍 许杨 熊亮 何庆华		
IPC分类号	C07K16/42 C12N15/13 C12N15/63 G01N33/53		
其他公开文献	CN103965358B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，设计一种模拟桔青霉素抗原的纳米抗体，具有 ( a ) SEQIDNO.:1 所示的氨基酸序列或将该序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有针对桔青霉素单克隆抗体或多克隆抗体结合活性的由 ( a ) 衍生的与 ( a ) 具有90%以上同源性的氨基酸序列。本发明纳米抗体能模拟模拟桔青霉素抗原，具有广阔的市场空间。

