



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110526968 B

(45) 授权公告日 2021.08.17

(21) 申请号 201910764180.3

G01N 33/53 (2006.01)

(22) 申请日 2019.08.19

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 101666802 A, 2010.03.10

申请公布号 CN 110526968 A

郭鹏利等. 基于纳米抗体的酶联免疫吸附法检测食品中金黄色葡萄球菌肠毒素B.《食品与发酵工业》.2019,第45卷(第20期),

(43) 申请公布日 2019.12.03

(73) 专利权人 西北农林科技大学

Zanganeh Saeed等. Rapid and Sensitive Detection of Staphylococcal Enterotoxin B by Recombinant Nanobody Using Phage Display Technology.《APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY》.2018,第187卷(第2期),

地址 712100 陕西省西安市杨凌示范区邠城路3号

(72) 发明人 季艳伟 郭鹏利 王建龙 王妍入
陈利莉 路云龙 李想

Turner Kendrick B.等. Isolation and Epitope Mapping of Staphylococcal Enterotoxin B Single-Domain Antibodies.《SENSORS》.2014,第14卷(第6期),

(74) 专利代理机构 西安恒泰知识产权代理事务所 61216

代理人 王孝明

审查员 杜润超

(51) Int. Cl.

C07K 16/12 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

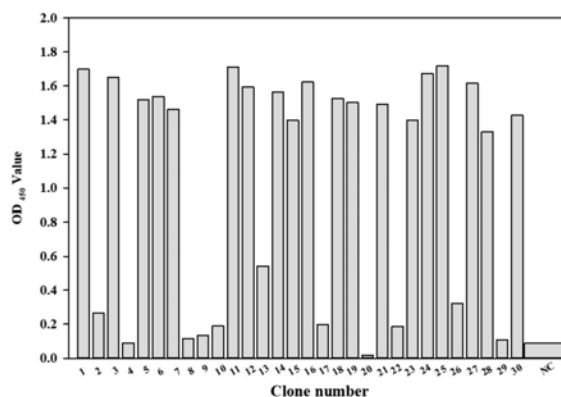
序列表3页 附图4页

(54) 发明名称

一种金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7、应用及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7、应用及试剂盒。本发明获得的纳米抗体具有相对分子质量小、稳定性强、产量高、能特异性识别SEB,较常规单克隆抗体用途更广,特异性更强。本发明公布了这种纳米抗体及编码该纳米抗体的基因序列,生产该纳米抗体的方法以及应用了该抗体的试剂盒。本发明获得的纳米抗体可避免与金黄色葡萄球菌表面蛋白A结合,表现出较高特异性,具有稳定性好、分子量小且可大规模生产。



1. 一种金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7, 其特征在于, 框架区FR1的氨基酸序列如SEQ ID NO.:2所示, FR2的氨基酸序列如SEQ ID NO.:4所示, FR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.:6所示, FR4的氨基酸序列如SEQ ID NO.:8所示;

互补决定区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO.:3所示, CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO.:5所示, CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.:7所示。

2. 一种金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7, 其特征在于, 所述的纳米抗体B7的氨基酸序列如SEQ ID NO.:1所示。

3. 如权利要求1所述的金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7, 其特征在于, 编码所述的金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7的核苷酸序列如SEQ ID NO.:9所示。

4. 一种权利要求1~3任一权利要求所述的金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7的制备方法, 其特征在于, 通过基因工程重组表达的方式进行制备;

所述基因工程重组表达的方式是指将一种权利要求1~3任一权利要求所述的金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7的编码基因, 通过克隆至表达载体, 以蛋白表达的形式进行纳米抗体的制备。

5. 权利要求1~3任一权利要求所述的金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7在制备金黄色葡萄球菌肠毒素B免疫学检测试剂中的应用。

6. 权利要求1~3任一权利要求所述的金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7用于制备金黄色葡萄球菌肠毒素B免疫检测试剂盒的应用。

7. 一种金黄色葡萄球菌肠毒素B免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述的试剂盒携带权利要求1~3任一权利要求所述的金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7。

一种金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7、应用及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7、应用及试剂。

背景技术

[0002] 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)是一种常见的食源性致病菌,由其引起的食品中毒在革兰氏阳性菌中高居首位,其致病能力主要取决于该菌产生的肠毒素(*Staphylococcal enterotoxins*, SEs)。SEs是由金黄色葡萄球菌分泌产生的可溶性胞外毒素蛋白质,结构相似,分子量为27.5~30kDa,热稳定性好,经100℃煮沸30min而不被破坏,因此,金黄色葡萄球菌污染的食物经过一般加热处理后,虽然细菌菌体可被杀死,但其产生的肠毒素仍然具有活性和致病力。按血清学分类,主要有A、B、Cs、D、E等血清型,其中SEB是SEs家族里毒力最强,对热最稳定,主要存在于肉类,乳等蛋白质含量较高的动物性食品中。当SEB摄入量达到20~100ng时就会使易感人群出现恶心,呕吐,腹痛和腹泻等中毒症状,因此,对食品中SEB的检测显得尤为重要。然而,SEB的检测存在两个主要问题:首先食物基质的成分较为复杂,含有多种蛋白质、脂类及其他化合物,这些成分的存在给SEB的准确检测造成了干扰;其次,SA在食物中往往仅产生痕量或微量的SEB(ng/g)这对检测方法的灵敏度提出了较高的要求。在食物基质中实现对肠毒素的定量检测一直是一项具有挑战性的任务。目前,免疫学检测方法因具有快速、特异性强、操作简便、结果易于判断等特点被广泛应用于SEs的快速检测中。其中免疫学检测法因具有操作简单、检测速度快等特点,是SEs例行筛查检测中最常用方法且发展较为成熟的检测方法,其原理为两个识别SEB表面的两个抗原位点的抗体,在SEB存在时形成夹心结构,借助检测抗体上的标记物从而判读检测结果。目前,国内外研究制备的金黄色葡萄球菌及其肠毒素抗体均为识别其表面抗原的多克隆抗体或单克隆抗体,但是传统单克隆抗体的制备耗时耗力且产量低,且葡萄球菌蛋白A(spA)的干扰是对SEs的基于免疫学检测中最重要的问题。SpA是金黄色葡萄球菌在细胞表面展示的蛋白质,也在外部释放,强烈结合哺乳动物产生的所有IgG的Fc端,因此,用于检测金黄色葡萄球菌毒素的抗体会产生假阳性结果,使方法准确性较差,从而影响了应用价值。

[0003] 纳米抗体技术,是在传统抗体的基础上,运用分子生物学技术研发得到,是目前已知最小的可结合抗原的抗体分子。最初有比利时科学家Hamers.R在骆驼血液中发现,普通的抗体蛋白由两条重链和两条轻链组成,而从骆驼血液中发现的新型抗体天然缺失轻链和重链恒定区1(CH1)的重链抗体,克隆其可变区得到只由一个重链可变区组成的单域抗体,称为单域重链抗体(Variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHH),又称为纳米抗体(nanobody, Nb)。纳米抗体与多克隆抗体和单克隆抗体相比,还具有以下优点:

[0004] 1) 无Fc识别位点,可避免与protein A结合导致的假阳性问题;

[0005] 2) 具有更长的CDR3区,且CDRs区和自身的另一些结构域不存在成对互补关系,故具有更多的柔韧性和凸面性,加之小体积(12~15kD, 2×2×4nm),能其更好的和抗原表面

的裂缝和腔隙相结合,从而提高纳米抗体的抗原特异性和亲和力,在纳摩尔至皮摩尔范围内都有很好的亲和力。在相同的检测范围内,单价纳米抗体的亲和力是普通二价抗体的两倍。特别对于表面结构较复杂的细菌或大分子蛋白等,纳米抗体将有利于克服表面结构的位阻效应与表面抗原识别。

[0006] 3) 纳米抗体稳定性高、水溶性好、可在微生物系统中大量合成表达,为纳米抗体低成本、高效率的生产创造了条件。

[0007] 4) 纳米抗体的C端(C-terminus)位于抗原结合位点的相反部位,易于进行定向功能化修饰,进而进行定向修饰。

[0008] 目前针对SEB的纳米抗体尚未见报道,因此针对SEB高亲和力、高特异、成本低的纳米抗体的开发,有利于进一步提高SEB免疫学检测的灵敏度和特异性,以达到现场检测的要求。

发明内容

[0009] 针对上述现有技术不足与缺陷,本发明的目的在于,提供一种金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7、应用及试剂盒,解决现有技术中的抗体特异性差,检测方法成本高、操作复杂的技术问题。

[0010] 为了达到上述目的,本申请采用如下技术方案予以实现:

[0011] 一种金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7,包括了框架区FR和互补决定区CDR,所述框架区FR包括FR1~FR4的氨基酸序列,

[0012] 其中FR1的氨基酸序列如SEQ ID NO.:2所示,FR2的氨基酸序列如SEQ ID NO.:4所示,FR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.:6所示,FR4的氨基酸序列如SEQ ID NO.:8所示;

[0013] 所述互补决定区CDR包括CDR1~CDR3的氨基酸序列,

[0014] 其中CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO.:3所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO.:5所示,CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.:7所示。

[0015] 一种金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7,所述的纳米抗体B7的氨基酸序列如SEQ ID NO.:1所示。

[0016] 编码所述的金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7的核苷酸序列如SEQ ID NO.:9所示。

[0017] 一种金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B1的制备方法,其特征在于,在驼源免疫的纳米抗体库中筛选能与靶分子SEB特异性结合的纳米抗体,并通过噬菌体扩增或基因工程重组表达的方式进行制备;

[0018] 所述噬菌体扩增是将展示有抗SEB纳米抗体的噬菌体,通过生物扩增的方式,繁殖生产展示有SEB纳米抗体的噬菌体粒子;

[0019] 所述基因工程重组表达的方式是指将纳米抗体的基因,通过克隆至表达载体,以蛋白表达的形式进行纳米抗体的制备。

[0020] 所述的金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7在金黄色葡萄球菌肠毒素B免疫学检测中的应用。

[0021] 所述的金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7用于制备金黄色葡萄球菌肠毒素B免疫检测试剂盒的应用。

[0022] 一种金黄色葡萄球菌肠毒素B免疫检测试剂盒,所述的试剂盒携带所述的金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7。

[0023] 本发明与现有技术相比,有益的技术效果是:

[0024] (I) 本发明获得的纳米抗体具有相对分子质量小、稳定性强、产量高、能特异性识别SEB,较常规单克隆抗体用途更广,特异性更强。

[0025] (II) 本发明获得的纳米抗体可避免与金黄色葡萄球菌表面蛋白A结合,表现出较高特异性,具有稳定性好、分子量小且可大规模生产。

[0026] (III) 本发明获得的纳米抗体可解决现有检测方法成本高、操作复杂、特异性差的问题,具有广阔的应用前景

附图说明

[0027] 图1是为淘选阳性克隆直接ELISA鉴定结果,其中克隆B7 OD值最大;

[0028] 图2是纳米抗体B7的SDS-PAGE图;

[0029] 图3是为以纳米抗体B7建立的直接ELISA标准曲线,线性范围是7.81~1000ng/mL,线性关系为 $R^2=0.99$,最低检测限为3.26ng/mL;

[0030] 图4是纳米抗体B7的耐酸碱性分析;

[0031] 图5是纳米抗体B7的热稳定性分析;

[0032] 图6是纳米抗体B7的特异性分析

[0033] 以下结合附图和实施例对本发明的具体内容作进一步详细解释说明。

具体实施方式

[0034] 以下给出本发明的具体实施例,需要说明的是本发明并不局限于以下具体实施例,凡在本申请技术方案基础上做的等同变换均落入本发明的保护范围。

[0035] 本发明采用SEB免疫阿拉善双峰驼,从经免疫的双峰驼的外周血淋巴细胞中提取其RNA,特异性扩增骆驼单链抗体可变区基因,从而构建纳米抗体基因库,分析其库容量及多样性。通过用噬菌体展示技术,从纳米抗体库中筛选能与靶分子(SEB)特异性结合的纳米抗体,构建纳米抗体B7表达载体,对其进行原核表达、纯化与鉴定,即得到所需要的纳米抗体B7。采用淘选得到的纳米抗体建立ELISA检测法。本发明制备的纳米抗体作为一种新型的基因工程抗体,由于其独特的结构特征,抗原识别能力强,可用于快速、准确的SEB检测。

[0036] 本发明采用SEB免疫双峰驼,然后利用该双峰驼外周血淋巴细胞建立了针对金黄色葡萄球菌肠毒素A的噬菌体展示纳米抗体文库。随后试验中将金黄色葡萄球菌肠毒素A吸附在酶标板上,利用噬菌体展示技术筛选免疫性的纳米抗体文库,从而获得了针对了一种金黄色葡萄球菌肠毒素A的特异性纳米抗体B7,其具有SEQ ID NO.:1所述的氨基酸序列。

[0037] 本发明所提及的纳米抗体包括四个框架区(Framework region,FR)和三个互补决定区(Complementarity-determining region,CDR)。其中,框架区(FR1~FR4)分别选自SEQ ID NO.:2,SEQ ID NO.:4,SEQ ID NO.:6和SEQ ID NO.:8,互补决定区分别为(CDR1~CDR3)分别选自SEQ ID NO.:3,SEQ ID NO.:5和SEQ ID NO.:7。框架区结构相对保守,主要起着维持蛋白质结构的作用;互补决定区结构相对多样化,主要负责抗体的识别。

[0038] 本发明还涉及编码该纳米抗体氨基酸序列的核苷酸,其序列为SEQ ID NO.:9。

[0039] 本发明提及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该纳米抗体的噬菌体,通过生物扩增的方式,大量繁殖生产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纳米抗体的基因,通过克隆至表达载体,以蛋白表达的形式进行该纳米抗体的大量制备。

[0040] 本发明还涉及所述的纳米抗体在免疫学检测中的应用。免疫学检测的类型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类型。

[0041] 本发明所述的纳米抗体在应用时,可以通过噬菌体扩增获得的展示有纳米抗体的噬菌体粒子直接用于分析检测,当然,也可以将纳米抗体经过原核生物或真核生物表达后以蛋白的形式进行免疫学检测分析。

[0042] 本发明所述的氨基酸序列可以作为前体,通过随机或定点突变技术进行改造,能够获得性质(亲和力、特异性和稳定性等)更好的突变体。

[0043] 实施例1、驼源纳米抗体噬菌体展示文库的构建

[0044] 1) 双峰驼的免疫

[0045] 以SEB作为免疫原采用皮下多点注射方式免疫成年雄性阿拉善双峰驼,共进行五轮免疫。初次免疫采用弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant)与等体积的免疫抗原乳化后进行注射,免疫剂量为100 μ g/只。往后每隔两周加强免疫一次,采用弗氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant)与等体积的免疫原乳化后进行注射,每次免疫剂量为50 μ g/只。第五次加强免疫后第七天,采取双峰驼外周血,用于构建纳米抗体噬菌体展示文库。

[0046] 2) 淋巴细胞的分离

[0047] 最后一次免疫后第7天,用一次性塑料血袋(含抗凝剂)采集200mL外周血,使用前用等体积的PBS稀释血液样品。将Ficoll-Paque PLUS淋巴细胞分离液平衡至室温,吸取15mL加入Leucosep®淋巴细胞分离管(带多孔隔板),用水平转子离心机1000g室温离心30s,使淋巴细胞分离液刚好位于筛网以下。将稀释好的血液样品平衡至室温后加入淋巴细胞分离管,30mL/支,用水平转子离心机1000g室温离心10min,离心机制动加速度调为0。离心后红细胞位于淋巴细胞分离管底部,最上层为血浆,血浆与白色透明淋巴细胞分离液之间的一层环装乳白色物质即为淋巴细胞,用滴管小心移去上层血浆,直到距离细胞层5~10mm。用滴管收集淋巴细胞至另一干净的50mL离心管中,加入至少10倍体积的冰浴的PBS,颠倒混匀后,250g,4℃离心10min。弃去上清,用45mL冰浴的PBS重悬细胞,250g,4℃离心10min,用同样方法再洗涤细胞两次。最后一次离心后,用10mL冰浴的PBS重悬细胞,用血细胞计数板进行计数,计数后分装于1.5mL离心管中,1 $\times 10^7$ 个细胞/支,250g、4℃离心10min,弃上清,细胞沉淀直接用于RNA提取,或-80℃保存备用。

[0048] 3) 淋巴细胞RNA的提取

[0049] 在离心管中加入1mL Trizol试剂,用移液器吹打离心管底部的淋巴细胞团块,将其打散;

[0050] 向上述裂解液中加入1/5体积氯仿。盖紧离心管盖,剧烈震荡15s,室温静置5min。4℃,12000g离心10-15min。小心吸取上层水相至新离心管中,加入1/2体积异丙醇。颠倒混匀后室温放置10min。4℃,12000g离心10min。小心弃去上清,加入等体积75%乙醇。涡旋充分洗涤,并轻弹管底,让沉淀悬浮起来。4℃,7500g离心5min,弃上清。室温放置空气干燥5~

10min。加入30~100μL无RNase水溶解RNA,待完全溶解后,取少量检测,其余溶液-70℃保存。测定总RNA的OD₂₆₀及OD₂₆₀/OD₂₈₀,确定总RNA的浓度和质量。

[0051] 4) cDNA的合成和VHH基因的扩增

[0052] 以总RNA为模板,采用反转录PCR经两步反应合成cDNA,具体步骤如下:按照反转录PCR体系1(见表1)配制反应体系,65℃反应5min后立即冰浴;在第一步反应液中加入按照反转录PCR体系2(见表2)配制反应体系中,反应条件42℃,30min,50℃,60min,70℃,15min;PCR产物-20℃冻存储备用。

[0053] 表1反转录PCR体系1

[0054]	Reagent	Reagent Volum(μL)
[0055]	d NTP Mixture (10m M each)	3.0
	Oligo d T Primer (2.5 μM)	3.0
	Total RNA X	<15μg
	RNase-Free dH ₂ O	Up to 30μL

[0056] 表2反转录PCR体系2

[0057]	Reagent	Reagent Volum (μL)
	System1	10
	5×Prime Script Buffer	4.0
	RNA Inhibitor (40U/μL)	0.5
	Prime Script RTase (for2step)	0.5
	dH ₂ O	Up to 20 μL

[0058] 根据双峰驼VHH上下游序列,用Primer Premier 5.0软件设计PCR引物,并送公司合成引物,序列如下:

[0059] CALL001:GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG

[0060] CALL002:GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

[0061] VHH-FOR:5'-CATGCCATGACTGTGGCCAGGCGGCCGAGTCTGGRGGAGG-3'

[0062] VHH-REV:5'-CATGCCATGACTCGCGCCGGCCTGGCCGAGACGGTGACCGGGT-3'。

[0063] 第一轮PCR:

[0064] 以cDNA为模板,利用引物CALL001和引物CALL002进行第一轮PCR扩增,反应体系为PCR体系3,详见表3:

[0065] 表3第一轮PCR体系3

	Reagent	Reagent Volum (μL)
[0066]	CALL01(10 μM)	1
	CALL02(10 μM)	1
	Premix Taq	20
[0067]	cDNA	2
	RNase-Free dH ₂ O	Up to 40 μL

[0068] 反应条件:95℃、5min,95℃、30s;55℃、30s,72℃、45s;30个循环;72℃、10min。4℃保存。PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定,切去700bp附近的条带,用割胶回收试剂盒按照说明书操作步骤回收PCR产物,测定回收产物的浓度用于下一步实验。

[0069] 第二轮PCR:以第一轮PCR胶回收产物(700bp附近的条带)为模板,用引物VHH-FOR和VHH-REV扩增VHH基因片段,反应体系为4:详见表4;反应条件:98℃、10s,55℃、15s,72℃、30s;72℃、10min,30个循环。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,切取目的条带(400bp附近),用胶回收试剂盒按照说明书操作步骤回收PCR产物,测定回收产物的浓度用于下一步实验。

[0070] 表4第二轮PCR体系4

	Reagent	Reagent Volum (μL)
[0071]	5×Prime STAR Buffer	5.0
	d NTP Mixture (2.5mM each)	2.0
	Prime F(10 μM)	1.0
	Prime R(10 μM)	1.0
	Prime STAR(2.5U/ μL)	0.25
	Template	X
	RNase-Free dH ₂ O	Up to 25 μL

[0072] 5) 文库的构建和鉴定:

[0073] 载体和插入片段的酶切反应

[0074] 按照表5的酶切体系,Sfi I 50℃过夜酶切pHEN I噬菌粒载体和VHH片段。

[0075] 表5Sfi I酶切反应体系

	reagent Volum (μL)
	10×M Buffer
[0076]	Sfi I
	pHEN I or VHH
	RNase-Free dH ₂ O

[0077] 琼脂糖凝胶电泳检测酶切是否完全,采用DNA纯化试剂盒纯化回收酶切产物。

[0078] 载体和插入片段的连接

[0079] 按表6的连接体系进行连接反应,并设置阴性对照和阳性对照。

[0080] 表6连接反应体系

	Reagent	Test group	NC	PC
	vector/Sfi I	200.0ng	200ng	200ng
	Insert	20-100ng		
[0081]	10*Ligase Buffer	5μL	5μL	5μL
	Ligase	0.5μL	0.5μL	0.5μL
	dH ₂ O	Up to 50μL	Up to 50μL	Up to 50μL

[0082] 16℃反应12h;加入5μL 3M乙酸钠 (pH5.2) 后,再加入125μL的冷无水乙醇,-20℃放置1h。4℃,10000g离心15min,弃上清;70%的冷乙醇清洗沉淀;4℃,10000g离心5min,弃上清;真空干燥后,20μL无菌水重悬沉淀,定量并-20℃冻存备用。

[0083] 连接产物的电转化

[0084] 取5μL连接产物加至80μL感受态细胞E.coli TG1中,充分混匀,冰上放置1min。转入0.1cm的电击杯中电击转化(电压为1.8kV),立即向电击杯中加入900μL LB培养基,37℃160rpm培养1h。将菌液涂布于LB-AG平板,37℃倒置培养过夜

[0085] 初始文库的救援

[0086] 接种超过10倍库容量的细胞于100mL 2×YT/amp/2%葡萄糖,培养至OD600达0.5;加入辅助噬菌体(20:1感染复数),37℃,静置15min后,220rpm培养45min;4℃,1000g离心10min;弃上清,加入100mL新鲜的2×YT/amp/kan培养基重悬沉淀,30℃培养过夜;4℃10000rpm离心10min,取上清;加入1/5体积的PEG-NaCl溶液,4℃静置3~4h;4℃10000rpm离心15min,弃上清,沉淀用1mLPBS重悬;取10μL测定库容,其余加入终浓度50%甘油,-80℃保存。

[0087] 实施例2:纳米抗体的亲和淘选及其鉴定

[0088] 1) 纳米抗体的亲和淘选:首先,用PBS (pH7.4) 将SEB稀释至终浓度50μg/mL,4℃包被过夜。第二天用PBST (10mM PBS,0.1%Tween-20 (v/v)) 洗涤5次后,加入5%BSA-PBS(或5%OVA-PBS) 37℃封闭1小时。然后用PBST洗涤6次,每孔加入100μL驼源单域重链抗体库(滴度约 2.0×10^{11} cfu),37℃孵育2小时。弃去未结合的噬菌体,用PBST洗涤10次,加入100μL的Glycine-HCl (0.2M,pH2.2) 洗脱8min后,立即用15μL Tris-HCl (1M,pH9.1) 中和。取10μL洗

脱噬菌体测定滴度,其余的用于感染25mL生长至对数期的E.coli TG1菌株进行扩增。第三天用PEG/NaCl沉淀扩增后的噬菌体,并测定噬菌体的滴度。

[0089] 在第二、第三和第四轮的淘选过程中,包被的SEB浓度分别为25 μ g/mL,12.5 μ g/mL和6.25 μ g/mL,加入噬菌体孵育后用PBST洗涤次数分别为12次,15次和18次,其余步骤同上。

[0090] 2) 阳性噬菌体克隆的鉴定:从第三轮和第四轮淘选后测定噬菌体滴度的平板上随机挑取50个克隆,进行噬菌体的扩增,采用酶联免疫吸附检测方法进行阳性噬菌体克隆的鉴定。具体方法为:首先,用PBS (pH7.4) 将SEB稀释至500ng/mL,4 $^{\circ}$ C包被过夜。第二天用PBST (10mM PBS,0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤3次后,加入300 μ L的5%脱脂奶粉,37 $^{\circ}$ C封闭2小时;弃封闭液,PBST洗涤3次后,加入100 μ L噬菌体扩增液 (2.0×10^{11} cfu),以原始噬菌体肽库作为阴性对照,37 $^{\circ}$ C孵育1小时;加入1:5000倍稀释的HRP标记抗M13噬菌体二抗100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1小时;加入100 μ L TMB底物溶液,避光显色10min;加入50 μ L终止液 (2M H_2SO_4) 终止反应;用酶标仪 (Thermo Scientific Multiskan FC) 测定450nm处的吸收值。选取OD₄₅₀大于阴性对照2倍的噬菌体克隆为阳性克隆,共得到23株阳性克隆,分别为B1-B3,B5-B7,B9-B19,B21-B28,B30 (附图1所示)。

[0091] 实施例3:纳米抗体编码基因的测序及其氨基酸序列的确定

[0092] 将B7克隆进行DNA测序,根据DNA测序结果及密码子表可获得纳米抗体的氨基酸序列。

[0093] 实施例4:B7纳米抗体的大量制备

[0094] (1) 以噬菌体扩增的方式进行制备

[0095] 将展示有阳性纳米抗体的噬菌体加入至20mL接种有E.coli TG1的培养物中,37 $^{\circ}$ C、220rpm振荡培养6h。将培养物转入另一离心管中,4 $^{\circ}$ C、10000rpm离心10min,将上清的上部80%转入一新鲜的离心管中,加入1/6体积的PEG/NaCl,4 $^{\circ}$ C静置120min后,4 $^{\circ}$ C、10000rpm离心10min,弃上清;再加入少量PBS清洗噬菌体。4 $^{\circ}$ C 10000rpm离心10min,弃上清,加入1mL PBS进行重悬,即为噬菌体扩增液。

[0096] (2) 以蛋白表达的形式进行制备

[0097] 提取B7克隆的质粒,将重组表达载体转入大肠杆菌Top10'。从转化平板上挑一单菌落接种于5mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,220r/min振荡培养过夜,将过夜培养物按1%接种量 (v/v) 接种于50mL的LB/Amp,2%葡萄糖培养基中,37 $^{\circ}$ C,220r/min振荡培养;当培养物菌体浓度OD₆₀₀达到0.5时,向培养物中加入0.1mM的IPTG,30 $^{\circ}$ C,220r/min振荡培养8~12h;将培养物于4 $^{\circ}$ C,8000rpm,离心20min收集菌体沉淀。重悬细胞于5mL预冷的PBS溶液,超声破碎10min后,8000rpm离心20min取上清,将上清进行亲和层析纯化,即得表达的纳米抗体B7。

[0098] 实施例5:标准曲线的建立

[0099] 采用ELISA的方法进行灵敏度的鉴定,具体方法为:用PBS (pH7.4) 将SEB至1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125、3.90625 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C包被过夜;第二天用PBST (10mM PBS,0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤5次后,加入300 μ L的3%脱脂奶粉,37 $^{\circ}$ C封闭1小时;加入100 μ L 10 μ g/mL的纳米抗体B7,37 $^{\circ}$ C孵育1小时;加入1:10000稀释HRP标记的抗His抗体100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1小时;加入100 μ L TMB底物溶液,避光显色10min,测定OD₄₅₀,绘制标准曲线 (如图2所示),线性范围是16.63~1000ng/mL,线性关系为 $R^2=0.99$,最低检测限为5.91ng/mL,表现出较好的灵敏度。

[0100] 实施例6纳米抗体的稳定性评估

[0101] (1) pH稳定性实验

[0102] 用PBS (pH7.4) 将SEB至1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125、3.90625 μ g/mL, 4℃包被过夜;第二天用PBST (10mM PBS, 0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤3次后, 加入300 μ L的3%脱脂奶粉, 37℃封闭1小时; PBST (10mM PBS, 0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤3次; 将纳米抗体分别用pH5.0, 6.0, 7.4, 8.0和9.0的PBS稀释至10 μ g/mL, 37℃孵育1小时; 加入1:10000稀释HRP标记的抗His抗体100 μ L, 37℃孵育1小时; 加入100 μ L TMB底物溶液, 避光显色10min, 测定OD₄₅₀, 比较不同pH值的OD₄₅₀变化, 以得出耐酸碱能力。实验结果如图3所示, 结果表明在pH6~8之间, 其SC₅₀ (半饱和信号值浓度) 无显著性差异, 表明纳米抗体B7具有一定的耐酸碱稳定性。

[0103] (2) 耐热实验

[0104] 包被: 用PBS (pH7.4) 将SEB至1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125、3.90625 μ g/mL, 4℃包被过夜;第二天用PBST (10mM PBS, 0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤3次后, 加入300 μ L的3%脱脂奶粉, 37℃封闭1小时; PBST (10mM PBS, 0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤3次; 将纳米抗体用PBS稀释至10 μ g/mL, 分别置于37, 50, 70, 90℃水浴10min, 恢复到室温后, 再分别取100 μ L加入处理好的板条中, 37℃孵育1小时; 加入1:10000稀释HRP标记的抗His抗体100 μ L, 37℃孵育1小时; 加入100 μ L TMB底物溶液, 避光显色10min, 测定OD₄₅₀。比较不同温度处理条件下的吸光度值, 得出纳米抗体的耐热能力, 结果表明在37~70℃之间, 其SC₅₀ (半饱和信号值浓度) 无显著性差异, 表明纳米抗体B7具有一定的热稳定性, 如图5所示。

[0105] 实施例7: 特异性鉴定

[0106] 采用ELISA的方法进行阳性纳米抗体的特异性鉴定, 具体方法为: 用PBS (pH7.4) 将金黄色葡萄球菌肠毒素B、金黄色葡萄球菌肠毒素A分别稀释至500ng/mL, 将金黄色葡萄球菌ATCC25923, 金黄色葡萄球菌ATCC29213、金黄色葡萄球菌ATCC26111分别稀释至10⁷cfu/mL, 4℃包被过夜; 用PBST (10mM PBS, 0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤3次后, 加入300 μ L的3%脱脂奶粉, 37℃封闭1小时; 用PBST (10mM PBS, 0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤3次后, 加入100 μ L辣根过氧化物酶与纳米抗体的偶联物, 37℃孵育1小时; 用PBST (10mM PBS, 0.05% Tween-20 (v/v)) 洗涤3次后, 加入100 μ L TMB底物溶液, 避光显色10min, 加入50 μ L 2M H₂SO₄终止液终止反应后, 测定OD₄₅₀。结果见图2, B7纳米抗体与金黄色葡萄球菌肠毒素B、金黄色葡萄球菌ATCC25923, 金黄色葡萄球菌ATCC29213、金黄色葡萄球菌ATCC26111均无交叉反应, 表明纳米抗体B7与金黄色葡萄球菌表明蛋白A无结合, 表现出较好的特异性。

说明书核苷酸或氨基酸序列表

核苷酸序列表电子文件

<110> 西北农林科技大学

<120> 一种金黄色葡萄球菌肠毒素 B 纳米抗体 B7、应用及试剂盒

<130> 2018

<160> 9

<170> PatentIn Version 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> Llama

<400> 1

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu

1 5 10 15

Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Phe Arg Glu His Ala Leu Ala

20 25 30

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys

35 40 45

Ile Arg Gly Ser Gly Asp Tyr Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Thr Leu Tyr

[0107] 65 70 75

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr

80 85 90

Cys Ala Ala Ala Arg Tyr Ala Arg Tyr Tyr Pro Asn Asn Cys Leu

95 100 105

Asp Ser Ala Glu Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

110 115 120 122

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Llama

<220>

<221> Domain

<222> (1)..(20)

<223> FR1

<400> 2

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Val Ser

1 5 10 15 20

<210>3

<211>10

<212> PRT

[0108]

<213>Llama

<220>

<221> Domain

<222> (1)..(10)

<223> CDR1

<400>3

Gly Phe Asn Phe Arg Glu His Ala Leu Ala

1 5 10

<210>4

<211> 18

<212> PRT

<213> Llama

<220>

<221> Domain

<222> (1)..(16)

<223> FR2

<400>4

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile

1 5 10 15 16

<210>5

<211>10

<212> PRT

<213> Llama

<220>

<221> Domain

<222> (1)..(10)

<223> CDR2

<400>5

Arg Gly Ser Gly Asp Tyr Thr Thr Tyr Ala

1 5 10

<210>6

<211>37

<212> PRT

<213> Llama

<220>

<221> Domain

<222> (1)..(37)

<223>FR3

<400>6

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln

1 5 10 15

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr

20 25 30

Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala
35 37

<210>7

<211>19

<212> PRT

<213> Llama

<220>

<221> Domain

<222> (1)..(19)

<223>CDR3

<400>7

Ala Arg Tyr Ala Arg Tyr Tyr Pro Asn Asn Cys Leu Asp Ser Ala
1 5 10 15
Glu Tyr Gly Tyr
19

<210>8

<211>10

<212> PRT

[0109] <213> Llama

<220>

<221> Domain

<222> (1)..(10)

<223>FR4

<400>8

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
1 10

<210>9

<211>366

<212>DNA

<213> Llama

<400>9

gagtctgggg gaggttggg gcaggccggg gggctctga gactctcctg taaagtctct	60
ggatttaatt ttcgtgagca tggcctggcc tggttccgcc aggtccagg aaaagagcgc	120
gaggggggtct catgtattcg cgggagtggt gattacacaa cttatgcaga ctccgtgaag	180
ggccgattca ccatcaccag agacaacgct cagaacaccc tgtatctgca aatgaacagc	240
ctcagacctg aggacacggc catgtattac tgtgcggcag cgcggtacgc gcggtactat	300
cctaacaatt gtctggattc agcggaatat ggggtactggg gccaggggac cctggtcacc	360
gtctcc	366

[0001]	核苷酸序列表电子文件				
[0002]	<110> 西北农林科技大学				
[0003]	<120> 一种金黄色葡萄球菌肠毒素B纳米抗体B7、应用及试剂盒				
[0004]	<130> 2018				
[0005]	<160> 9				
[0006]	<170> PatentIn Version 3.5				
[0007]	<210> 1				
[0008]	<211> 122				
[0009]	<212> PRT				
[0010]	<213> Llama				
[0011]	<400> 1				
[0012]	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
[0013]	1	5	10	15	
[0014]	Ser	Cys	Lys	Val	Ser
[0015]	20	25	30		
[0016]	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala
[0017]	35	40	45		
[0018]	Ile	Arg	Gly	Ser	Gly
[0019]	50	55	60		
[0020]	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile
[0021]	65	70	75		
[0022]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser
[0023]	80	85	90		
[0024]	Cys	Ala	Ala	Ala	Arg
[0025]	95	100	105		
[0026]	Asp	Ser	Ala	Glu	Tyr
[0027]	110	115	120	122	
[0028]	<210> 2				
[0029]	<211> 20				
[0030]	<212> PRT				
[0031]	<213> Llama				
[0032]	<220>				
[0033]	<221> Domain				
[0034]	<222> (1) .. (20)				
[0035]	<223> FR1				
[0036]	<400> 2				
[0037]	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
[0038]	1	5	10	15	20
[0039]	<210>3				
[0040]	<211>10				
[0041]	<212> PRT				
[0042]	<213>Llama				

[0043]	<220>
[0044]	<221> Domain
[0045]	<222> (1) .. (10)
[0046]	<223> CDR1
[0047]	<400>3
[0048]	Gly Phe Asn Phe Arg Glu His Ala Leu Ala
[0049]	1 5 10
[0050]	<210>4
[0051]	<211> 18
[0052]	<212> PRT
[0053]	<213> Llama
[0054]	<220>
[0055]	<221> Domain
[0056]	<222> (1) .. (16)
[0057]	<223> FR2
[0058]	<400>4
[0059]	Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile
[0060]	1 5 10 15 16
[0061]	<210>5
[0062]	<211>10
[0063]	<212> PRT
[0064]	<213> Llama
[0065]	<220>
[0066]	<221> Domain
[0067]	<222> (1) .. (10)
[0068]	<223> CDR2
[0069]	<400>5
[0070]	Arg Gly Ser Gly Asp Tyr Thr Thr Tyr Ala
[0071]	1 5 10
[0072]	<210>6
[0073]	<211>37
[0074]	<212> PRT
[0075]	<213> Llama
[0076]	<220>
[0077]	<221> Domain
[0078]	<222> (1) .. (37)
[0079]	<223>FR3
[0080]	<400>6
[0081]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln
[0082]	1 5 10 15
[0083]	Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
[0084]	20 25 30
[0085]	Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala

[0086]	35	37
[0087]	<210>7	
[0088]	<211>19	
[0089]	<212> PRT	
[0090]	<213> Llama	
[0091]	<220>	
[0092]	<221> Domain	
[0093]	<222> (1) .. (19)	
[0094]	<223>CDR3	
[0095]	<400>7	
[0096]	Ala Arg Tyr Ala Arg Tyr Tyr Pro Asn Asn Cys Leu Asp Ser Ala	
[0097]	1	5 10 15
[0098]	Glu Tyr Gly Tyr	
[0099]	19	
[0100]	<210>8	
[0101]	<211>10	
[0102]	<212> PRT	
[0103]	<213> Llama	
[0104]	<220>	
[0105]	<221> Domain	
[0106]	<222> (1) .. (10)	
[0107]	<223>FR4	
[0108]	<400>8	
[0109]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
[0110]	1	5 10
[0111]	<210>9	
[0112]	<211>366	
[0113]	<212>DNA	
[0114]	<213> Llama	
[0115]	<400>8	
[0116]	gagtctgggg gaggtcttggg gcaggccggg gggctctctga gactctcctg taaagtctct 60	
[0117]	ggattttaatt ttcgtgagca tgccctggcc tggttccgcc aggtccagg aaaagagcgc 120	
[0118]	gagggggtct catgtattcg cgggagtggt gattacacaa cttatgcaga ctccgtgaag 180	
[0119]	ggccgattca ccattctccag agacaacgct cagaacaccc tgtatctgca aatgaacagc 240	
[0120]	ctcagacctg aggacacggc catgtattac tgtgcggcag cgcggtacgc gcggtactat 300	
[0121]	cctaacaatt gtctggattc agcggaatat gggtactggg gccaggggac cctgggtcacc 360	
[0122]	gtctcc 366	

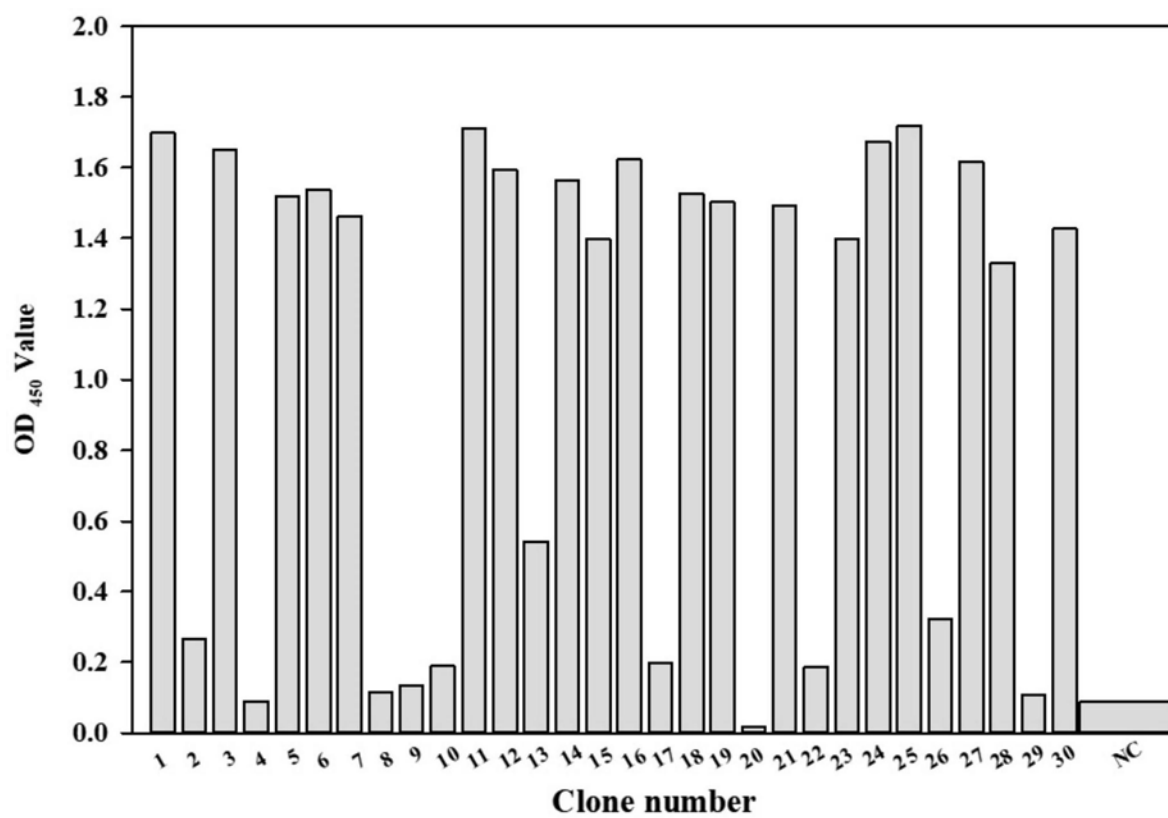


图1

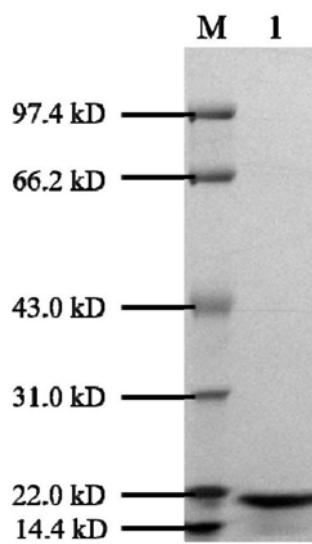


图2

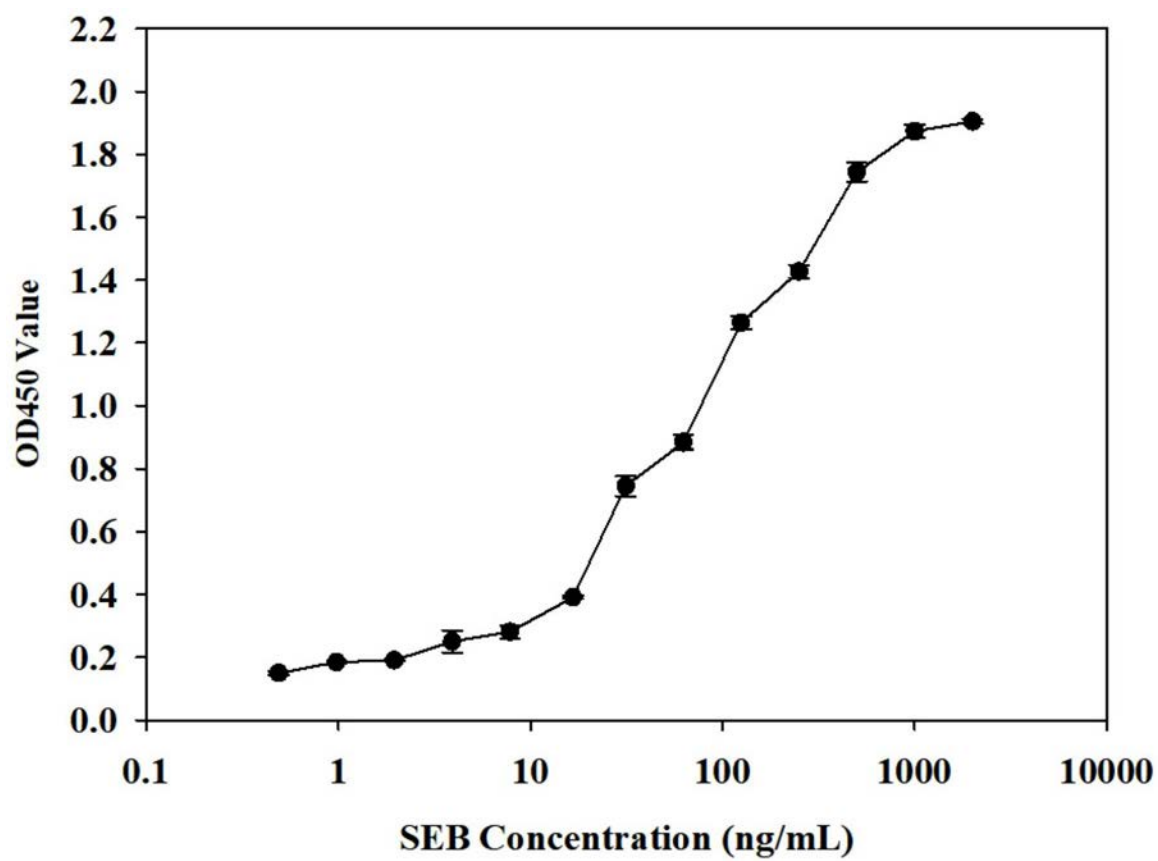


图3

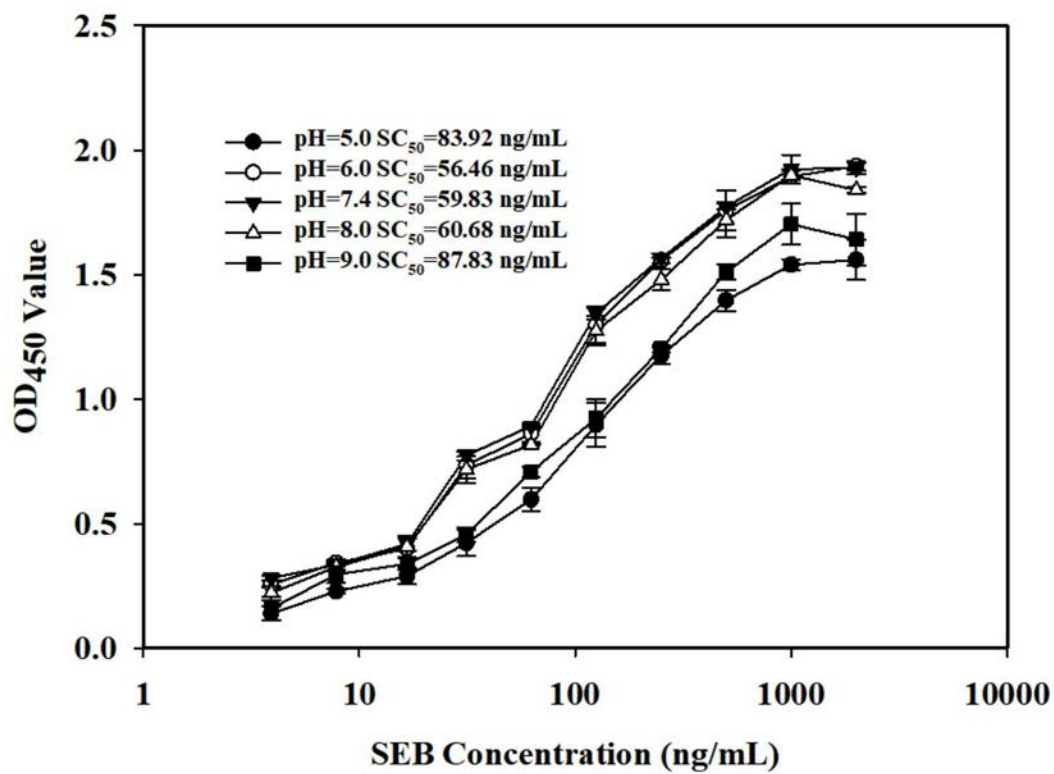


图4

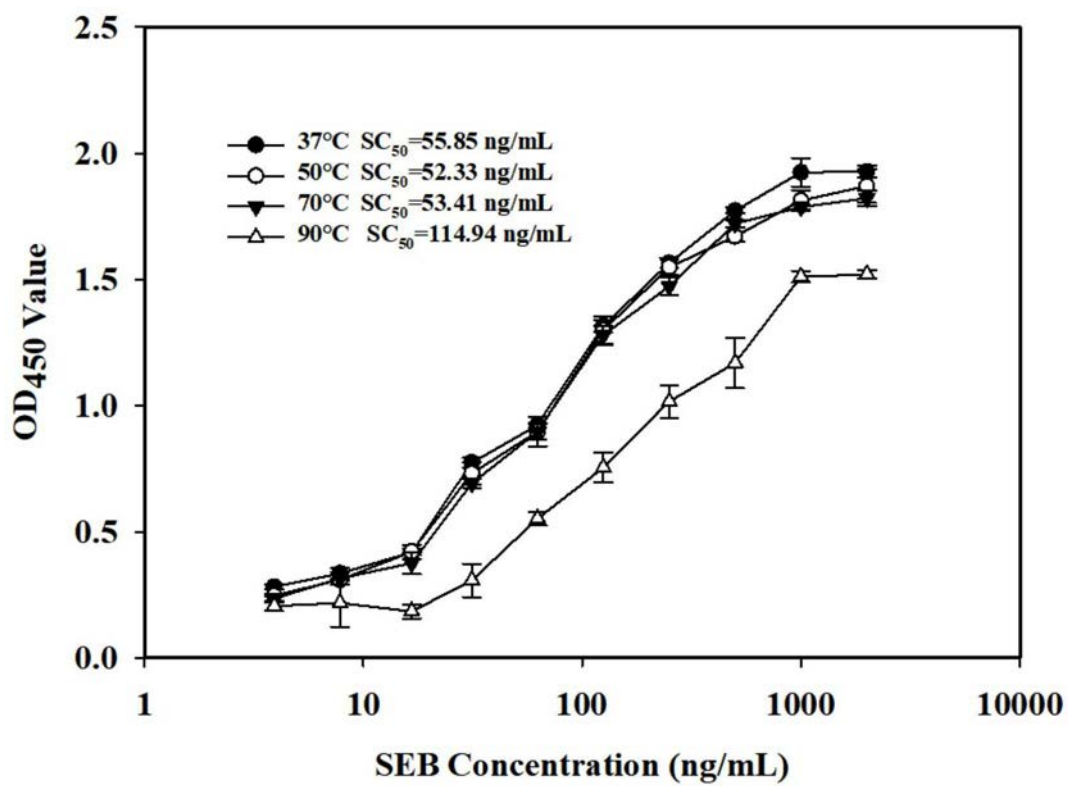


图5

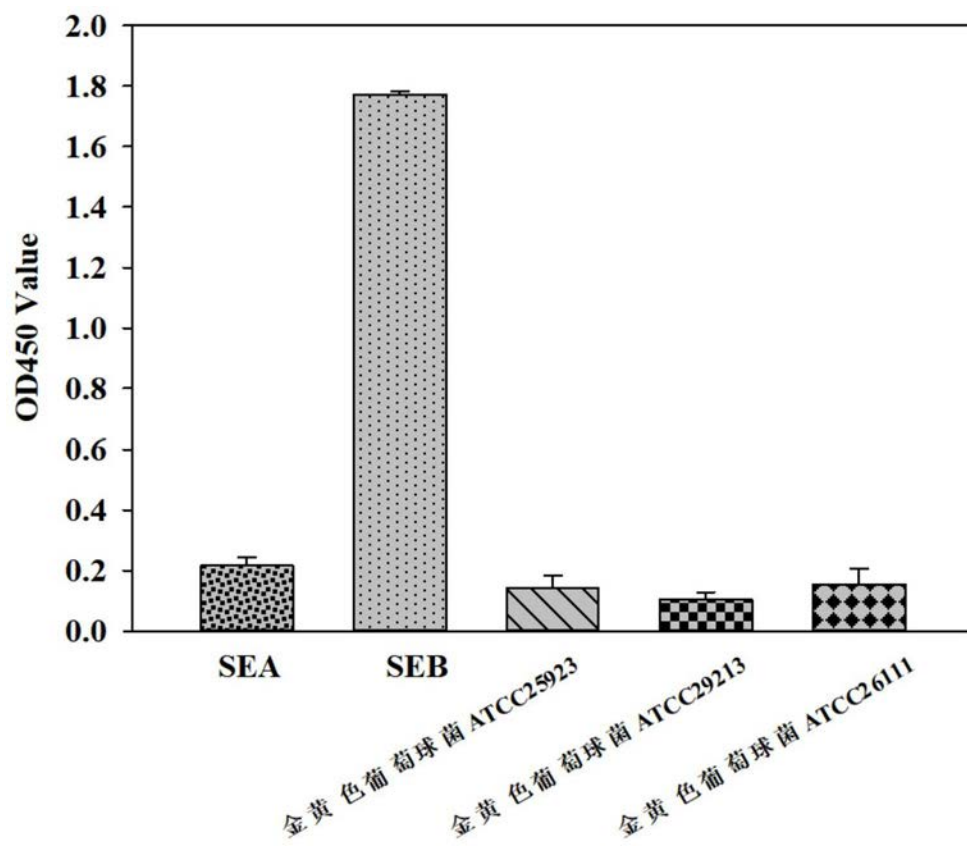


图6