



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110655574 B

(45) 授权公告日 2021. 02. 02

(21) 申请号 201911087476.2

C12N 15/13 (2006.01)

(22) 申请日 2019.11.08

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110655574 A

审查员 刘芳

(43) 申请公布日 2020.01.07

(73) 专利权人 北京兰博利德商贸有限公司

地址 100085 北京市海淀区上地信息路1号
2号楼204号

专利权人 天津科技大学

(72) 发明人 董春明

(74) 专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限公司 12209

代理人 韩晓梅

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

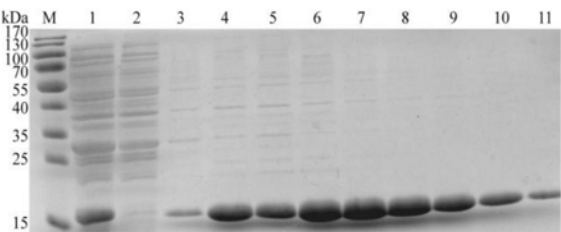
权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一种针对绿色荧光蛋白的纳米抗体、应用和
GFP免疫亲和吸附材料

(57) 摘要

本发明涉及一种针对绿色荧光蛋白的纳米抗体,所述抗体具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。本纳米抗体是一种可以与GFP特异性结合的单域抗体重链抗体(即纳米抗体),可以用于GFP及GFP融合蛋白的检测及纯化,例如用于制备检测和纯化GFP的试剂和工具等。



1. 一种针对绿色荧光蛋白的纳米抗体,其特征在于:所述抗体具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。

2. 一种编码如权利要求1所述的氨基酸序列的核酸分子。

3. 根据权利要求2所述的核酸分子,其特征在于:所述核酸分子的序列为SEQ ID NO.2。

4. 一种包含如权利要求2或3所述的核酸分子的载体。

5. 一种包含如权利要求4所述的载体的宿主细胞。

6. 如权利要求1所述的针对绿色荧光蛋白的纳米抗体在绿色荧光蛋白、绿色荧光蛋白融合蛋白的富集、检测、纯化方面中的应用。

7. 利用如权利要求1所述的针对绿色荧光蛋白的纳米抗体制得的GFP免疫亲和吸附材料,其特征在于:步骤如下:

采用琼脂糖微球作为载体,偶联抗GFP纳米抗体,具体制备如下:

将CNBr活化的干胶,用0.1M HCl洗涤10次,每次平衡5min;用偶联缓冲液洗涤10次,该偶联缓冲液为pH7.2、10mM的 Na_2HPO_4 溶液,加入抗GFP标签纳米抗体,2mg/每克干胶,室温反应3.5h,使抗GFP标签纳米抗体与CNBr活化的干胶共价偶联;

用偶联缓冲液洗涤3次后,该偶联缓冲液为pH7.2、10mM的 Na_2HPO_4 溶液,加入封闭液室温反应2h以封闭未反应的活性基团;

用6倍胶体积的磷酸缓冲液和醋酸缓冲液交替洗涤3次,得到共价偶联了抗GFP标签纳米抗体的免疫亲和吸附材料;

其中,所述磷酸缓冲液为10mM、pH7.2,所述醋酸缓冲液为0.1M、pH4.5。

8. 根据权利要求7所述的针对绿色荧光蛋白的纳米抗体制得的GFP免疫亲和吸附材料,其特征在于:所述干胶为琼脂糖凝胶微球、硅球或纳米磁珠。

一种针对绿色荧光蛋白的纳米抗体、应用和GFP免疫亲和吸附材料

技术领域

[0001] 本发明属于单域重链抗体技术(又称纳米抗体技术)、基因工程抗体技术领域,尤其是一种针对绿色荧光蛋白(GFP)的纳米抗体、应用和GFP免疫亲和吸附材料。

背景技术

[0002] GFP是一个由约238个氨基酸组成的蛋白质,从蓝光到紫外线都能使其激发,发出绿色荧光。GFP广泛应用于免疫学检测、细胞成像、亲和纯化及蛋白质工程等领域。

[0003] 目前市场上大部分是针对GFP的单克隆或多克隆抗体用于检测,但单克隆抗体的研发和生产过程极其繁琐和复杂,且抗体稳定性差、生产成本低,多克隆抗体来源有限。由于传统抗体含有Fc段,容易有非特异性结合或污染。相比之下,纳米抗体仅由一个结构域组成,具有耐酸碱、耐高温、特异性高、分子量小和可大规模生产等优点,且没有普通抗体的重链和轻链的非特异性结合或污染。用纳米抗体作为配基制备的纯化介质具有成本低、可重复使用等优点,应用前景广阔。

[0004] 通过检索,发现如下两篇与本发明专利申请相关的专利公开文献:

[0005] 1、绿色荧光蛋白纳米抗体的编码基因及其制备方法和应用(CN108753792A),构建了GFP纳米抗体文库。利用噬菌体展示技术,从该抗体文库中筛选到了四个特异结合GFP的纳米抗体,分别命名为A12、E6、D5和B9。测序获得了这四个纳米抗体基因的核苷酸序列,如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示,其对应的氨基酸序列如SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示。将A12基因克隆到改造的表达载体pADL-10b-His中,并导入SS320菌株中;将E6、D5和B9基因分别克隆到改造的表达载体pBAD24-Flag-His中,并分别导入TOP10菌株中,从而获得了四个纳米抗体的原核表达载体和菌株。本发明表达纯化了四个纳米抗体并证明了四个GFP纳米抗体能够特异结合GFP,可应用于基础研究中GFP的检测。

[0006] 2、一种针对绿色荧光蛋白的纳米抗体及其编码序列(CN108484764A),所述抗体是含有SEQ ID NO:1所示互补决定区1氨基酸序列、SEQ ID NO:2所示互补决定区2氨基酸序列及SEQ ID NO:3所示互补决定区3氨基酸序列。本发明的一种针对EGFP纳米抗体能够良好地特异性结合绿色荧光蛋白。

[0007] 通过对比,本发明专利申请与上述专利公开文献存在本质的不同。

发明内容

[0008] 本发明目的在于克服现有技术中的不足之处,提供一种针对绿色荧光蛋白(GFP)的纳米抗体、应用和GFP免疫亲和吸附材料,该纳米抗体是一种可以与GFP特异性结合的单域抗体重链抗体(即纳米抗体),可以用于GFP及GFP融合蛋白的检测及纯化,例如用于制备检测和纯化GFP的试剂和工具等。

[0009] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

- [0010] 一种针对绿色荧光蛋白的纳米抗体,所述抗体具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。
- [0011] 而且,所述抗体的氨基酸序列可以分为四个框架区和三个互补决定区。
- [0012] 一种编码如上所述的氨基酸序列的核酸分子。
- [0013] 而且,所述核酸分子的序列为SEQ ID NO.2。
- [0014] 一种包含如上所述的核酸分子的载体。
- [0015] 一种包含如上所述的载体的宿主细胞。
- [0016] 如上所述的针对绿色荧光蛋白的纳米抗体在免疫检测、或绿色荧光蛋白、绿色荧光蛋白融合蛋白的富集、检测、纯化方面中的应用。
- [0017] 如上所述的针对绿色荧光蛋白的纳米抗体通过随机或定点突变技术进行改造所获得的能与GFP特异性结合的抗体。
- [0018] 利用如上所述的针对绿色荧光蛋白的纳米抗体制得的GFP免疫亲和吸附材料,步骤如下:
- [0019] 采用琼脂糖微球作为载体,偶联抗GFP纳米抗体(即本发明针对绿色荧光蛋白的纳米抗体),具体制备如下:
- [0020] 将CNBr活化的干胶,用0.1M HCl洗涤10次,每次平衡5min;用偶联缓冲液洗涤10次,该偶联缓冲液为pH7.2、10mM的 Na_2HPO_4 溶液,加入抗GFP标签纳米抗体,2mg/每克干胶,室温反应3.5h,使抗GFP标签纳米抗体(即本发明针对绿色荧光蛋白的纳米抗体)与CNBr活化的干胶共价偶联;
- [0021] 用偶联缓冲液洗涤3次后,该偶联缓冲液为pH7.2、10mM的 Na_2HPO_4 溶液,加入封闭液室温反应2h以封闭未反应的活性基团;
- [0022] 用6倍胶体积的磷酸缓冲液和醋酸缓冲液交替洗涤3次,得到共价偶联了抗GFP标签纳米抗体的免疫亲和吸附材料;
- [0023] 其中,所述磷酸缓冲液为10mM、pH7.2,所述醋酸缓冲液为0.1M、pH4.5。
- [0024] 而且,所述干胶为琼脂糖凝胶微球、硅球或纳米磁珠。
- [0025] 本发明取得的优点和积极效果为:
- [0026] 1、本发明纳米抗体是一种可以与GFP特异性结合的单域抗体重链抗体(即纳米抗体),可以用于GFP及GFP融合蛋白的检测及纯化,例如用于制备检测和纯化GFP的试剂和工具等。
- [0027] 2、通过本发明所公开的纳米抗体基因序列及宿主细胞,该纳米抗体能够在大肠杆菌内高效表达,生产过程简单,成本低,产量高。
- [0028] 3、本发明纳米抗体仅由一个结构域组成,具有耐酸碱、耐高温、特异性高、分子量小和可大规模生产等优点,且没有普通抗体的重链和轻链的非特异性结合或污染。

附图说明

- [0029] 图1为本发明中纳米抗体的基因电泳图;其中,泳道1是DNA分子标准,泳道2是PCR扩增重链抗体可变区片段;
- [0030] 图2为本发明中对于所构建的GFP特异性的单域抗体文库进行的菌落PCR电泳图;其中,泳道1是DNA分子标准,泳道2-25是在所构建的GFP纳米抗体文库中随机的挑取克隆,

通过菌落PCR检测文库的插入率,计算结果表明文库插入率至100%;

[0031] 图3为本发明中是用噬菌体的酶联免疫方法(ELISA)筛选特异性单个阳性克隆的模式图;其中,1是将载脂蛋白偶联在酶标板上,2是纳米抗体,3是鼠抗HA抗体,4是山羊抗小鼠碱性磷酸酶标记的抗体,5是碱性磷酸酶显色液;

[0032] 图4为本发明中表达的GFP纳米抗体,经镍柱树脂凝胶亲和层析纯化后的SDS-PAGE的电泳图;其中,泳道1是蛋白分子标准,泳道2是破菌后蛋白总的粗提液样品,泳道3是总的蛋白粗提液过镍柱后的样品,泳道4是含50毫摩尔咪唑洗脱液所洗脱的样品,泳道5是含100毫摩尔咪唑洗脱液所洗脱的样品,6-7是250毫摩尔咪唑洗脱液所洗脱的样品,8-11是500毫摩尔咪唑洗脱液所洗脱的样品。

具体实施方式

[0033] 下面详细叙述本发明的实施例,需要说明的是,本实施例是叙述性的,不是限定性的,不能以此限定本发明的保护范围。

[0034] 本发明中所使用的原料,如无特殊说明,均为常规的市售产品;本发明中所使用的方法,如无特殊说明,均为本领域的常规方法。

[0035] 一种针对绿色荧光蛋白的纳米抗体,所述抗体具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。

[0036] 较优地,所述抗体的氨基酸序列可以分为四个框架区和三个互补决定区。

[0037] 一种编码如上所述的氨基酸序列的核酸分子。

[0038] 较优地,所述核酸分子的序列为SEQ ID NO.2。

[0039] 一种包含如上所述的核酸分子的载体。

[0040] 一种包含如上所述的载体的宿主细胞。

[0041] 如上所述的针对绿色荧光蛋白的纳米抗体在免疫检测、或绿色荧光蛋白、绿色荧光蛋白融合蛋白的富集、检测、纯化方面中的应用。

[0042] 如上所述的针对绿色荧光蛋白的纳米抗体通过随机或定点突变技术进行改造所获得的能与GFP特异性结合的抗体。

[0043] 利用如上所述的针对绿色荧光蛋白的纳米抗体制得的GFP免疫亲和吸附材料,步骤如下:

[0044] 采用琼脂糖微球作为载体,偶联抗GFP纳米抗体(即本发明针对绿色荧光蛋白的纳米抗体),具体制备如下:

[0045] 将CNBr活化的干胶,用0.1M HCl洗涤10次,每次平衡5min;用偶联缓冲液洗涤10次,该偶联缓冲液为pH7.2、10mM的 Na_2HPO_4 溶液,加入抗GFP标签纳米抗体,2mg/每克干胶,室温反应3.5h,使抗GFP标签纳米抗体(即本发明针对绿色荧光蛋白的纳米抗体)与CNBr活化的干胶共价偶联;

[0046] 用偶联缓冲液洗涤3次后,该偶联缓冲液为pH7.2、10mM的 Na_2HPO_4 溶液,加入封闭液室温反应2h以封闭未反应的活性基团;

[0047] 用6倍胶体积的磷酸缓冲液和醋酸缓冲液交替洗涤3次,得到共价偶联了抗GFP标签纳米抗体的免疫亲和吸附材料;

[0048] 其中,所述磷酸缓冲液为10mM、pH7.2,所述醋酸缓冲液为0.1M、pH4.5。

[0049] 较优地,所述干胶为琼脂糖凝胶微球、硅球或纳米磁珠。

[0050] 本发明提供一个针对GFP的纳米抗体,具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。其氨基酸序列可以分为四个框架区(Framework region,FR)和三个互补决定区(complementarity determining region,CDR)。

[0051] 本发明还提供一个核酸分子,编码SEQ ID NO.2,通过遗传密码子可以随时获得该核酸分子的具体序列。

[0052] 本发明提供的核酸序列或者至少部分序列可以通过合适的表达系统进行表达以得到相应的蛋白质或多肽。这些表达系统包括细菌,酵母,丝状真菌,动物细胞,植物细胞,昆虫细胞,或无细胞表达系统。

[0053] 本发明还提供一种载体,包含所述核酸序列。由于遗传密码子具有简并性,该核酸序列可以不同的应用母的不同。

[0054] 本发明还提供一种宿主细胞,包含所述蛋白质或表达载体。

[0055] 本发明所提供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,获得性质(水溶性、稳定性、亲和力及特异性等)更好的突变体,该突变体能够与GFP特异性结合。

[0056] 本发明还涉及针对GFP的纳米抗体在免疫检测、富集及纯化中的应用。

[0057] 本发明还涉及针对GFP的免疫亲和吸附材料,该材料能够以针对GFP的纳米抗体作为配基,所述针对GFP的纳米抗体具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。载体材料不限于琼脂糖凝胶,也可以选用硅球、纳米磁珠等。

[0058] 本发明的相关制备及检测如下:

[0059] 本发明首先将绿色荧光蛋白(GFP)免疫一只新疆双峰驼,经过4次免疫之后提取该双峰驼外周血淋巴细胞并构建了GFP特异的纳米抗体文库。将GFP偶联在酶标板上,展示蛋白质的正确空间结构,使得GFP的抗原表位得以暴露出来,以此形式的抗原利用噬菌体展示技术筛选GFP免疫性的纳米抗体基因库(骆驼重链抗体噬菌体展示基因库),而获得了能在大肠杆菌中高效表达的纳米抗体株。

[0060] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。

[0061] 实施例1:针对于GFP的纳米抗体文库的构建:

[0062] (1) GFP浓度为500微克每毫升,每次免疫将1毫克GFP与弗氏佐剂等体积混合,免疫一只新疆双峰驼,每周一次,共免疫4次,除第一次使用完全的弗氏佐剂,剩余几次全部使用弗式不全佐剂,免疫过程中刺激B细胞表达抗原特异性的纳米抗体。

[0063] (2) 4次免疫结束后,提取骆驼外周血淋巴细胞100ml并提取总RNA,参照QIAGEN公司提供的RNA提取试剂盒。

[0064] (3) 按照Super-Script III FIRST STRANDSUPERMIX试剂盒说明书,将提取的RNA反转录成cDNA并利用套式PCR扩增VHH链,第一轮PCR:

[0065] 上游引物:GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGGC

[0066] 下游引物:GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

[0067] 扩增重链抗体引导肽和抗体CH2之间的片段,54℃退火,25个循环;

[0068] 第二轮PCR:

[0069] 以第一轮PCR产物作模板,

[0070] 上游引物:GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG

[0071] 下游引物:GGACTAGTGC GGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT

[0072] 扩增重链抗体FR1区和长、短铰链区之间的片段(长片段和短片段),60℃退火,17个循环,回收目的片段,结果如图1显示,从左到右的DNA条带分别是:第一为100bP的分子Marker,第二纳米抗体基因电泳带约为500bp。

[0073] (4) 使用限制性的内切酶(购自NEB) PstI及NotI酶切20μg pComb3噬菌体展示载体(Biovector供应)及10μg VHH,并用T4 DNA连接酶(购自TaKaRa公司)连接两个片段。

[0074] (5) 将连接产物电转化至电转感受态细胞TG1(北京神州红叶科技有限公司)中,构建GFP的纳米抗体噬菌体展示文库并测定库容,库容的大小为 1.8×10^8 ;与此同时,通过菌落PCR检测所建文库的插入率检测结果,插入率约100%,图2显示菌落PCR结果。文库构建完成后,为检测文库的插入率,随机地选取24颗克隆做菌落PCR。结果显示:插入率已达到100%。

[0075] 实施例2:针对GFP的纳米抗体筛选过程:

[0076] (1) 将溶解在100毫摩pH 8.2NaHCO₃中的GFP200微克偶联在酶标板上,4℃放置过夜,同时设立负对照。

[0077] (2) 第二天两个孔中分别加入100微升0.1%酪蛋白,室温封闭2小时。

[0078] (3) 2小时后,加入100μl噬菌体(8×10^{11} tfu免疫骆驼纳米抗体噬菌展示基因库),在室温下作用1小时。

[0079] (4) 用PBST(PBS中含有0.05%吐温20)洗5遍,以洗掉不结合的噬菌体。

[0080] (5) 用三乙基胺(100mM)将与GFP特异性结合的噬菌体解离下,并感染处于对数期生长的大肠杆菌TG1,产生并纯化噬菌体用于下一轮的筛选,相同筛选过程重复3-4轮。在不断地筛选的过程中,阳性的克隆将不断地被富集,从而达到了利用噬菌体展示技术筛选抗体库中GFP特异抗体的目的。原理模式图如图3所示。

[0081] 实施例3:用噬菌体的酶联免疫方法(ELISA)筛选特异性单个阳性克隆:

[0082] (1) 从上述3-4轮筛选后含有噬菌体的细胞培养皿中,挑选96个单个菌落并接种于含有100微克每毫升的氨苄青霉素的TB培养基(1升TB培养基中含有2.3克磷酸二氢钾,12.52克磷酸氢二钾,12克蛋白胨,24克酵母提取物,4毫升甘油)中,生长至对数期后,加终浓度1毫摩尔的IPTG,28℃培养过夜。

[0083] (2) 利用渗透法获得粗提抗体,并将抗体转移到经抗原包被的ELISA板中,在室温下放置1小时。

[0084] (3) 用PBST洗去未结合的抗体,加入一mouse anti-HA tag antibody(抗鼠抗HA抗体,购自北京康为世纪生物科技有限公司),在室温下放置1小时。

[0085] (4) 用PBST洗去未结合的抗体,加入anti-mouse alkaline phosphatase conjugate(山羊抗小鼠碱性磷酸酶标记抗体,购自艾美捷科技有限公司),在室温下放置1小时。

[0086] (5) 用PBST洗去未结合的抗体,加入碱性磷酸酶显色液,于ELISA仪上,在405nm波长,读取吸收值。

[0087] (6) 当样品孔OD值大于对照孔OD值3倍以上时,判为阳性克隆孔。

[0088] (7) 将阳性克隆孔的菌转摇在含有100微克每毫升的LB液体中以便提取质粒并进行测序。

[0089] 根据序列比对软件VectorNTI分析各个克隆株的基因序列,把CDR1,CDR2,CDR3序列相同的株视为同一克隆株,而其序列不同的株视为不同克隆株,最终1株抗体。其抗体的VHH链的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1所示,核酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0090] 实施例4:纳米抗体在宿主菌大肠杆菌中表达、纯化:

[0091] (1)将前面测序分析所获得两种纳米抗体亚克隆至表达性的载体PET-22b中,并将测序鉴定正确的重组质粒转化到表达型宿主菌DE3中,其涂布在含有100微克每毫升氨苄青霉素的LB固体培养基的板上,37℃过夜;(2)挑选单个菌落接种在15毫升含有100微克每毫升氨苄青霉素的LB培养液中,37℃摇床培养过夜;(3)接种1ml的过夜菌种至330ml LB培养基中,37℃摇床培养,培养到OD值达到0.6-1时,加入IPTG,28℃摇床培养过夜;(4)第二天,离心收菌;(5)将菌体破碎以获得抗体粗提液;(6)经镍柱离子亲和层析纯化抗体蛋白,为获得高纯度的抗体,采用咪唑梯度洗脱法,低浓度咪唑洗脱液(50毫摩尔,100毫摩尔)用于洗去杂带,高浓度咪唑洗脱液(250毫摩尔,500毫摩尔),最终可制备纯度达90%以上的蛋白。图4所示从左到右的条带分别是:第一为标准蛋白分子,第二为破菌后蛋白总的粗提液样品,第三为总的蛋白粗提液过镍柱后的样品,第四为含有50毫摩咪唑的洗脱液洗脱的样品,第五为含有100毫摩咪唑的洗脱液洗脱的样品,第六,七为含有250毫摩咪唑的洗脱液洗脱样品,第八、九、十为含有500毫摩咪唑的洗脱液洗脱样品;结果显示,纳米抗体经过该纯化后,其纯度可达到95%以上。

[0092] 实施例5GFP免疫亲和吸附材料的制备

[0093] 采用琼脂糖微球作为载体,偶联抗GFP纳米抗体,具体制备方法如下:

[0094] 将CNBr活化的干胶琼脂糖凝胶微球用0.1M HCl洗涤10次,每次平衡5min。用偶联缓冲液(10mM,NA₂HPO₄,pH7.2)洗涤10次,加入抗GFP标签纳米抗体(2mg/每克琼脂糖凝胶微球),室温反应3.5h,使抗GFP标签纳米抗体与CNBr活化的琼脂糖凝胶微球共价偶联。用偶联缓冲液(10mM,NA₂HPO₄,pH7.2)洗涤3次后,加入封闭液室温反应2h以封闭未反应的活性基团。用6倍胶体体积的磷酸缓冲液(10mM,pH7.2)和醋酸缓冲液(0.1M,pH4.5)交替洗涤3次,得到共价偶联了抗GFP标签纳米抗体的免疫亲和吸附材料。取0.2ml上述免疫亲和吸附材料于容量为1ml的层析柱,8~10倍柱体积的PBS(10mM,pH7.2)洗涤后,加入20%乙醇溶液,4℃保存。

[0095] SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列

[0096] QVQLQESGGGSVQPGGSLRLSCAASGYTYSNMVMGWFRQAPGKEREEVAIIYTGSGRTYYADSVKGRFTISQDNAKNTIYLMNSLKPEDTAIYYCAADFRTWRISWSWSEEGRWSYWGQGTQVTVSSAA

[0097] SEQ ID NO.:2

[0098] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGCCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGATACACTTATAGTATGAACTACATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGAGAGGAGGTTCG AGCTATTTATACTGGTAGTGGTCGCACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAACG CCAAGAACACGATATATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACCGCCATCTACTACTGTGCGGCAGATTTT CGCCCAACGTGGCGTATATCTGGTCTCTGGTCCGAGGAAGGGCGATGGAGCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCAC CGTCTCTCAGCGCCGC

[0099] 尽管为说明目的公开了本发明的实施例,但是本领域的技术人员可以理解:在不脱离本发明及所附权利要求的精神和范围内,各种替换、变化和修改都是可能的,因此,本

发明的范围不局限于实施例所公开的内容。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 北京兰博利德商贸有限公司,天津科技大学
[0003]	<120> 一种针对绿色荧光蛋白的纳米抗体、应用和GFP免疫亲和吸附材料
[0004]	<160> 2
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0
[0006]	<210> 1
[0007]	<211> 131
[0008]	<212> PRT
[0009]	<213> 纳米抗体的氨基酸序列 (Unknown)
[0010]	<400> 1
[0011]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
[0012]	1 5 10 15
[0013]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Ser Met Asn
[0014]	20 25 30
[0015]	Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Glu Val
[0016]	35 40 45
[0017]	Ala Ala Ile Tyr Thr Gly Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0018]	50 55 60
[0019]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
[0020]	65 70 75 80
[0021]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
[0022]	85 90 95
[0023]	Ala Ala Asp Phe Arg Pro Thr Trp Arg Ile Ser Trp Ser Trp Ser Glu
[0024]	100 105 110
[0025]	Glu Gly Arg Trp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
[0026]	115 120 125
[0027]	Ser Ala Ala
[0028]	130
[0029]	<210> 2
[0030]	<211> 395
[0031]	<212> DNA/RNA
[0032]	<213> 编码纳米抗体的核酸分子 (Unknown)
[0033]	<400> 2
[0034]	caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc tgggtgcagc ctggagggtc tctgagactc 60
[0035]	tcctgtgcag cctctggata cacttatagt atgaactaca tgggctgggt ccgccaggct 120
[0036]	ccagggaagg agcgagagga ggtgcgagct atttatactg gtagtggtcg cacatactat 180
[0037]	gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccaagaca acgccaagaa cacgatatat 240
[0038]	ctgcaaataa acagcctgaa acctgaggac accgccatct actactgtgc ggcagatttt 300

[0039] cgcccaacgt ggcgtatata ctggtcctgg tccgaggaag ggcgatggag ctactggggc 360
[0040] caggggaccc aggtcacctg ctcctcagcg gccgc 395

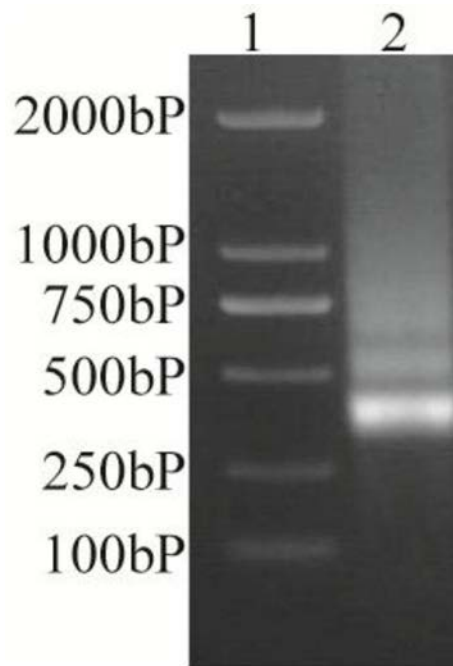


图1

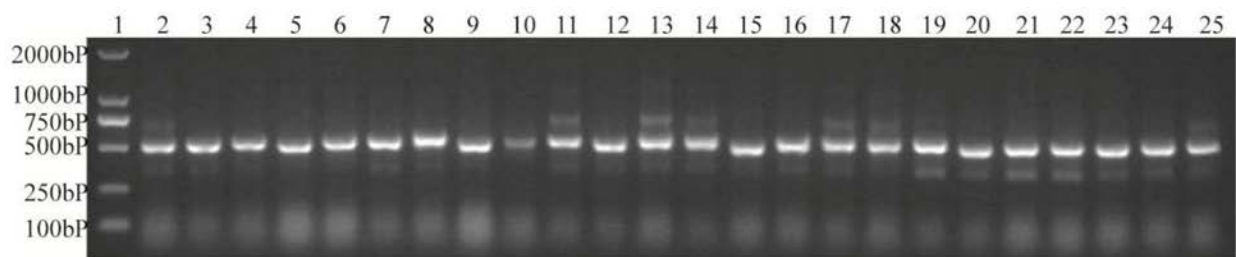


图2

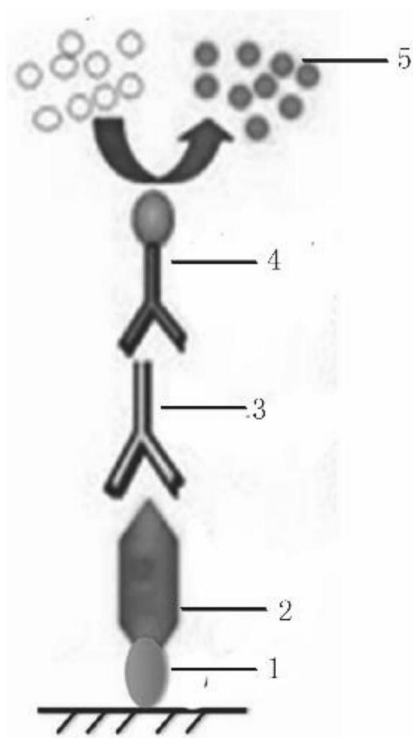


图3

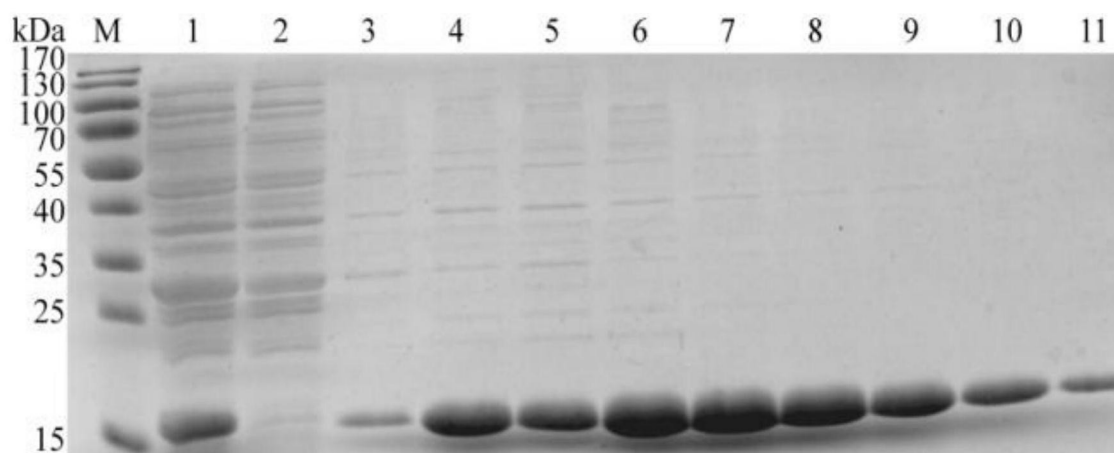


图4