



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106117350 A

(43)申请公布日 2016.11.16

(21)申请号 201610530405.5

B01J 20/24(2006.01)

(22)申请日 2016.07.07

B01J 20/281(2006.01)

(71)申请人 南昌大学

B01J 20/30(2006.01)

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府大道999号

B01D 15/38(2006.01)

(72)发明人 付金衡 周鹏 涂追 许杨

(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 刘华

(51)Int.Cl.

C07K 16/00(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表4页

(54)发明名称

一种免疫库来源的结合免疫球蛋白Fc段的纳米抗体

(57)摘要

本发明属于基因工程领域,具体为针对免疫球蛋白Fc段的单域重链抗体,其具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列,可用于免疫检测、抗原富集纯化等领域。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,能够获得性质(亲和性、特异性、稳定性等)更好的突变体,用来发展进一步用于医药、工业、农业的蛋白质或多肽。

1. 一种免疫库来源的结合免疫球蛋白Fc段的纳米抗体,具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。
2. 一种核酸分子,其特征是编码权利要求1中所述氨基酸序列。
3. 根据权利要求2所述的核酸分子,其特征在于序列如SEQ ID NO.:2。
4. 一种包含权利要求2所述的核酸序列的载体。
5. 一种包含权利要求4所述的载体的宿主细胞。
6. 权利要求1所述的结合免疫球蛋白Fc段的纳米抗体在免疫检测、富集纯化特异性识别免疫球蛋白中的应用。
7. 权利要求1所述的结合免疫球蛋白Fc段的纳米抗体在制备免疫球蛋白免疫检测、富集以及纯化试剂或材料中的应用。
8. 权利要求1所述的结合免疫球蛋白Fc段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免疫球蛋白特异性结合的抗体。
9. 一种针对免疫球蛋白Fc段的免疫亲和吸附材料,包括载体,搭载在载体上的配基,其特征在于该材料以结合免疫球蛋白Fc段的纳米抗体作为配基,所述结合免疫球蛋白Fc段的纳米抗体具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。

一种免疫库来源的结合免疫球蛋白Fc段的纳米抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及单域重链抗体技术(又称为纳米抗体技术),以及基因工程抗体技术,特别是涉及针对免疫球蛋白G(immunoglobulin G,IgG)Fc段(fragment crystalline,Fc)的单域重链抗体或多肽。

技术背景

[0002] 重链抗体(Heavy-chain antibody)是一种天然缺失轻链,仅由重链组成的抗体,存在于骆驼、鲨鱼等动物中。单域重链抗体(又称为纳米抗体,VHH抗体,variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody,下同)是指仅由重链抗体可变区(Variable region)组成的基因工程抗体。与普通抗体相比,单域重链抗体具有分子量小,稳定性高,水溶性好等优点,目前已广泛应用于基础研究、医学诊断和检测、药物研发等领域。

[0003] 免疫球蛋白G(immunoglobulin G,IgG)由两条相同的轻链和两条相同的重链组成。每条链都含有可变区(variable region,V区)和恒定区(constant region,C区),其中可变区提供抗原结合位点和特异性,恒定区构成免疫球蛋白的框架,具有生物效应功能。用木瓜蛋白酶消化IgG,可将其分成3个功能区,即2个相同的抗原结合片段(fragment antigen binding,Fab)和一个可结晶片段(fragment crystalline,Fc)。Fc段位于恒定区,由两条重链羧基端的一半组成。由于Fc段远离抗原结合部位,因此提供了一个与抗体结合而不影响抗原抗体反应的区域,是最有效的二抗试剂结合的表位区。

[0004] 目前,已有针对IgG Fc段的多克隆抗体、单克隆抗体等传统抗体的公开报道。与单域重链抗体相比,传统抗体存在生产成本较高,制备过程繁琐等缺点。

发明内容

[0005] 本发明之目的是提供针对免疫球蛋白G的Fc段的单域重链抗体(包括含有所述单域重链抗体全部或部分功能区域的蛋白质或多肽)及其氨基酸序列,可被用于制备检测或纯化、富集IgG的试剂和工具。

[0006] 本发明提供一种针对免疫球蛋白G的Fc段的单域重链抗体(即本发明一种免疫库来源的结合免疫球蛋白Fc段的纳米抗体),具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。

[0007] 其氨基酸序列的IMGT编号和结构域的划分包括四个框架区(Framework region,FR)和三个互补决定区(Complementarity-determining region,CDR)。互补决定区主要负责抗原的识别,框架区结构相对稳定,主要起着维持蛋白质结构的作用。

[0008] 本发明提供一个核酸分子,其特征是编码SEQ ID NO.:1,通过遗传密码子可以随时获得该核酸分子的具体序列。

[0009] 本发明还提供一个核酸分子,其特征是编码SEQ ID NO.:1部分结构域,通过遗传密码子可以随时获得该核酸分子的具体序列。可以为SEQ ID NO.:2核酸分子。

[0010] 本发明所提供的核苷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,酵母菌,丝状真菌,动物细胞,昆虫

细胞,植物细胞,或无细胞表达系统。

[0011] 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,该核酸序列可以根据不同的应用目的而不同。

[0012] 本发明还提供一种宿主细胞,包括所述蛋白质或表达载体。

[0013] 本发明还提供了一种纯化或检测免疫球蛋白G的方法,其特征是含有上述蛋白质或多肽。基于本发明提供的蛋白质或多肽与免疫球蛋白G特异性结合的能力,建立免疫球蛋白G的纯化或检测方法。其中,优选的方法包括酶联免疫吸附法(Enzyme-Linked immunosorbent assay,ELISA),荧光免疫法(Fluoroimmunoassay,FIA),免疫芯片法和亲和层析法。

[0014] 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,能够获得性质(水溶性、稳定性、亲和力以及特异性等)更好的突变体,用来发展进一步用于医药、工业、农业的蛋白质或多肽。

[0015] 本发明还涉及前述针对免疫球蛋白G Fc段的纳米抗体在免疫检测、富集以及纯化中的应用。这些免疫检测指的是非疾病诊断治疗目的的免疫检测。

[0016] 本发明还涉及针对免疫球蛋白G的Fc段的免疫亲和吸附材料,包括载体,搭载在载体上的配基,其特征在于该材料以针对免疫球蛋白G的Fc段的纳米抗体作为配基,所述针对免疫球蛋白G的Fc段的纳米抗体具有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。

[0017] 本发明中所叙述的一些术语具有如下含义:

[0018] 同源性:描述两个或更多氨基酸序列的相似程度,第一个氨基酸序列和第二个氨基酸序列之间同源性的百分比可以通过【第一氨基酸序列中与第二氨基酸序列中相应位置处的氨基酸残基相同的氨基酸残基的数量】除以【第一个氨基酸序列中氨基酸总数】再乘以【100%】来计算,其中第二氨基酸序列中的某个氨基酸的缺失、插入、替换或添加(与第一氨基酸相比)被认为是有差别。备选地,同源性百分比也可以利用已知的用于序列匹配的计算机运算程序如NCBI Blast获得。

[0019] 结构域:蛋白质三级结构的基本结构单位,通常具有一定的功能。

[0020] IMGT编号:IMGT数据库(The International ImMunoGeneTics Database)中的一种已经标准化的抗体氨基酸序列编号方法。具体编号方法可以参考文献(Ehrenmann,F.,Q.Kaas,et al.(2010).“IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign:a database and a tool for immunoglobulins or antibodies,T cell receptors,MHC,IgSF and MhcSF.”Nucleic Acids Res 38(Database issue):D301-307.Lefranc,M.P.,C.Pommie,et al.(2003).“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains.”Dev Comp Immunol 27(1):55-77.)中的描述。

[0021] 密码子(codon):又称为三联体密码(triplet code),指对应于某种氨基酸的核苷酸三联体。在转译过程中决定该种氨基酸插入生长中多肽链的位置。

[0022] 本发明提供了从免疫文库中获取的识别IgG Fc段的单域重链抗体,该单域重链抗体经过了亲和力成熟,具有更高的亲和力,识别位点是Fc的优势抗原表位。

具体实施方式

[0023] 下面通过单域中链抗体的制备、分析以及应用,对本发明作进一步说明,这些具体实施例不应以任何方式被解释为限制本发明的应用范围。

[0024] 实施例1:

[0025] 抗Fc单域重链抗体免疫文库的构建

[0026] 取300 μ g Fc重组蛋白(该蛋白可通过商业途径获得)与弗氏完全佐剂乳化后,对羊驼(Lama pacos)进行皮下多点注射免疫。加强免疫采用150 μ g Fc重组蛋白与弗氏不完全佐剂乳化,间隔2周进行,每次免疫7天后静脉取血,采用间接ELISA法测定血清效价,选择血清效价最高的样品分离淋巴细胞,提取RNA。

[0027] RNA的提取参照TAKARA公司RNAiso试剂说明书进行。以RNA为模板,oIigo dT为引物,参照TAKARA公司反转录酶说明书合成cDNA第一链。

[0028] 采用PrimeSTAR高保真DNA聚合酶,经巢式PCR获得重链抗体的可变区编码基因(采用的引物见表1)。第一轮PCR分别以引物A1pVh-LD和CH₂-R扩增cDNA,反应条件为,98 $^{\circ}$ C,10s,55 $^{\circ}$ C,20s,72 $^{\circ}$ C,1min,20个循环,98 $^{\circ}$ C,10s,68 $^{\circ}$ C,1min,72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0029] 将第一轮PCR产物用1.2%的琼脂糖凝胶电泳,回收600bp~750bp的DNA片段,作为第二轮PCR的模板,分别用引物A1pVh-SfiI和A1pVHHR1-NotI,A1pVh-SfiI和A1pVHHR2-NotI,进行扩增,反应条件为,98 $^{\circ}$ C,10s,50 $^{\circ}$ C,20s,72 $^{\circ}$ C,40s,5个循环,98 $^{\circ}$ C,10s,68 $^{\circ}$ C,40s,30个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10min。经DNA片段回收试剂盒回收、定量,于-20 $^{\circ}$ C保存备用。将噬菌粒pHEN1和PCR扩增产物分别用Sfi I、Not I双酶切,经琼脂糖凝胶回收、定量后,以1:3摩尔比,在16 $^{\circ}$ C,过夜连接。

[0030] 表1文库构建及鉴定所用的引物

[0031]

引物名称	序列
A1pVh-LD	5' - CTTGGTGGTCCTGGCTGC- 3'
A1pVh-SfiI	5' - <u>tcgcgcccccagccggcccatggcc</u> CAGKTGCAGCTCGTGGAGTCNGGNGG- 3'
A1pVHHR1-NotI	5' - cgagtg <u>cgggccgc</u> GGGGTCTTCGCTGTGGTGCG- 3'
A1pVHHR2-NotI	5' - cgagtg <u>cgggccgc</u> TTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG- 3'
CH ₂ -R	5' - GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC- 3'
M13-R	5' - AGCGGATAACAATTCACACAGGA- 3'
pHEN-R	5' - GCCCCATTCAGATCCTCTTC- 3'

[0032] 注:下划线表示限制性内切酶识别序列

[0033] 连接产物经乙醇沉淀后,溶于10 μ L无菌水,分十次进行电穿孔转化大肠杆菌TG1。取10 μ L电击、培养后的菌液倍比稀释,涂布氨苄青霉素2 \times YT培养板,37 $^{\circ}$ C,倒置培养12~16h,采用引物M13-R和pHEN-R进行菌落PCR,计算库容;其余部分全部涂布于24cm \times 24cm氨

苜青霉素2×YT培养板,37℃,倒置培养12~16h。用10mL,2×YT培养基将培养板上的菌苔刮洗后,加入终浓度15~30%甘油,分装,-80℃保存备用。

[0034] 根据计算的库容量结果,接种10倍库容量的活细胞于20mL的2×YT(含2%葡萄糖,100μg/mL氨苄青霉素),30℃,220r/min培养至OD600达0.5,按感染复数20:1加入辅助噬菌体,37℃,220r/min,60min。将培养物离心,用50mL的2×YT(含100μg/mL氨苄青霉素和50μg/mL卡那霉素)重悬沉淀,30℃,220r/min过夜培养后,3000g离心取上清,加入5×PEG/NaCl溶液,冰上放置1h或4℃过夜,12000rpm离心30min,重悬沉淀于含10%甘油的磷酸缓冲液(PBS,0.01M,pH 7.4),即得到抗Fc的单域重链抗体免疫文库,取10μL测定滴度,其余分装于-80℃保存备用。

[0035] 实施例2:

[0036] 抗IgG Fc段单域重链抗体的淘选与鉴定

[0037] 采用固相亲和淘选的方法从抗Fc的单域重链抗体免疫文库中淘选针对IgG Fc段的单域重链抗体。采用亲和层析法纯化小鼠血清,得到IgG溶液。用PBS稀释IgG溶液至50~100μg/mL,每孔加入100μL,4℃,包被过夜;吸出包被液,PBS洗板3次,每孔加入300μL 3%BSA-PBS,37℃,封闭2h;PBS洗板6次,加入100μL噬菌体抗体库(约含 2×10^{11} CFU),37℃,孵育1.5h;吸出未结合的噬菌体,用PBST(含0.5%Tween-20)洗板5次(逐轮增加1次),再用PBS洗板10次(洗板次数逐轮增加5次);以100μL洗脱液(甘氨酸-盐酸,pH 2.2)洗脱吸附在酶标孔中的噬菌体,用50μL Tris-HCl(1mol/L,pH 8.0)中和洗脱物,取10μL用于滴度测定,其余洗脱物扩增后用于下一轮淘选。

[0038] 经三轮淘选后,采用辅助噬菌体KM13对随机挑取的单克隆进行救援,分别得到展示抗体可变区的噬菌体颗粒,再用间接ELISA测定噬菌体颗粒的结合活性实验设定阳性对照、阴性对照及背景对照,具体加样步骤见表2。

[0039] 表2间接phage-ELISA加样表

	实验组	背景对照	空白对照 a	空白对照 b	
[0040]	包被	mIgG Fc	BSA	mIgG Fc	BSA
	封闭	1×Blocking buffer (3%脱脂牛奶 W/V)			
[0041]	结合	噬菌体	噬菌体	PBS	PBS
	二抗	HRP/anti-M13			

[0042] 将ELISA阳性克隆X送生物技术服务公司进行序列测定,得到插入片段的DNA序列,其编码针对免疫球蛋白Fc段的单域重链抗体,具体如下(SEQ ID NO.:2):

[0043] QVQLVESGGGLAQAGDSLRLSCLASGRNFSYATAWFRQVPGKDREFVAAISWSGGNTHYADSVKGRFTISRHNKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYYCATNERPGWVTLIKYYPYWGQGTQVTVSS

[0044] 依据DNA测序结果及密码子表可获得针对免疫球蛋白Fc段的单域重链抗体的氨基酸序列(SEQ ID NO.:1):

[0045] CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGAGGAGGATTGGCGCAGGCTGGGGACTCTCTGAGACTCTCCTGTTTTCCTCTGGACGCAACTTCAGTAGCTATGCCACGGCCTGGTTCCGCCAGGTTCCAGGAAGGACCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAGCTGGAGTGGTGGTAACACACACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGACACAACG

CCAAAAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGCAACCAACGAA
CGGCCGGGTTGGGTCACTCTCATCAAATATTATCCCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0046] 本发明提供的从免疫文库中获取的识别IgG Fc段的单域重链抗体,该单域重链抗体经过了亲和力成熟,经对照试验,相比常规的从天然抗体文库中分离获取的单域重链抗体具有更高的亲和力,识别位点是Fc的优势抗原表位。

[0047] 实施例3:

[0048] 抗IgG Fc段单域重链抗体在大肠杆菌中表达与纯化。

[0049] 编码抗IgG Fc段单域重链抗体的DNA片段的获取:1.采用限制性内切酶SfiI/NotI,双酶切噬菌粒pHEN-X,琼脂糖凝胶电泳回收抗IgG Fc段单域重链抗体基因;2.直接将抗IgG Fc段单域重链抗体编码序列送生物技术服务公司进行化学合成;3.设计特异性引物,通过PCR技术从羊驼(Lama pacos)来源的cDNA库中扩增。

[0050] 将得到的抗IgG Fc段单域重链抗体基因片段克隆至表达载体pRXS,经PCR和酶切鉴定,构建完成抗IgG Fc段单域重链抗体的大肠杆菌表达质粒,命名为pRXS-X。

[0051] 将表达质粒pRXS-X转化至大肠杆菌BL21,挑取单菌落进行诱导表达。将单菌落接入4mL LBA(Luria-Bertani broth with 100 μ g/mL ampicillin)液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、250r/min振荡培养12h;以1%培养基体积的接种量将其转接到50mL LBA液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、250r/min振荡培养至OD600达到0.5(约需2.5~3h),加入终浓度0.1mM的IPTG,30 $^{\circ}$ C、200r/min诱导培养。

[0052] 诱导培养物8000r/min离心,在细胞沉淀中加入20mL磷酸缓冲液(pH 7.4)混匀,8000r/min离心,去上清,保留细胞沉淀;在细胞沉淀中加入10mL相同缓冲液,混匀,冰上超声波细胞破碎处理,超声破碎条件为200W,破碎2s,间歇3s,共240个循环,在4 $^{\circ}$ C下对细胞破碎物12000r/min离心20min,取上清进行亲和层析纯化和SDS-PAGE电泳分析,或在上清中加入终浓度30%的甘油,混匀,保存于-20 $^{\circ}$ C冰柜待用。

[0053] 通过优化诱导表达条件(如宿主菌、表达载体、诱导培养时间、温度以及IPTG浓度等),可以进一步提高目的蛋白(单域抗体)表达量,为大量制备抗IgG单域抗体提供了途径。

[0054] 实施例4:

[0055] 抗IgG Fc段单域重链抗体的融合表达。

[0056] 将抗IgG Fc段单域重链抗体基因克隆至融合表达载体pAP,经PCR和酶切鉴定,构建完成抗IgG Fc段单域重链抗体的碱性磷酸酶融合表达质粒,命名为pAP-X。

[0057] 碱性磷酸酶可以非特异性催化磷酸单酯水解生成无机磷酸和相应的醇、酚或糖类化合物。该酶常作为信号标签用于ELISA、免疫印迹、组织化学等检测方法。融合表达质粒pAP-X将抗IgG Fc段单域重链抗体融合于碱性磷酸酶的N端,参考实施例3中的表达方法,可以在大肠杆菌中表达、纯化出融合蛋白AP-X。

[0058] 实施例5:

[0059] 基于抗IgG Fc段单域重链抗体的IgG检测方法。

[0060] 基于直接酶联免疫吸附试验的原理,建立检测IgG的方法。采用亲和层析纯化血清或腹水得到IgG溶液,或者购买商业化IgG产品;融合蛋白AP-X的制备参照应用实例3,显色试剂为分析纯对硝基苯磷酸二钠(pNPP \cdot 2Na)。

[0061] 检测步骤包括,(1)抗原包被:用10mM磷酸缓冲液(pH 7.4)将IgG稀释至5 μ g/mL,

100 μ L/孔,包被于酶标板,4 $^{\circ}$ C过夜,含0.5%Tween-20(W/V)的磷酸缓冲液洗板5次,拍干板条,加入3%脱脂牛奶(W/V),300 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭2h。(2)结合:磷酸缓冲液洗板3次后,加入倍比稀释的融合蛋白AP-X,100 μ L/孔,水平方向轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C温育30min。(3)取出温育后板条,磷酸缓冲液洗板5次,拍干,加入100 μ L/孔pNPP显色液,37 $^{\circ}$ C避光显色5min。(4)加入50 μ L/孔终止液(2M H₂SO₄),酶标仪读数。

[0062] 实施例6

[0063] 抗Fc单域重链抗体用于亲和纯化材料的制备

[0064] 将本发明重组表达的抗IgG Fc段单域重链抗体与固相载体琼脂糖偶联,具体方法如下:

[0065] 将CNBr活化的琼脂糖干胶用0.1M HCl洗涤10次,每次平衡5min。用偶联缓冲液(10mM,Na₂HPO₄,pH 7.4)洗涤10次,加入抗IgG Fc段单域重链抗体(2mg/每克琼脂糖微球),室温反应4h,使抗IgG Fc段单域重链抗体与CNBr活化的琼脂糖凝胶微球共价偶联。用偶联缓冲液(10mM,Na₂HPO₄,pH 7.4)洗涤2次后,加入封闭液室温反应2h以封闭未反应的活性基团。用5被胶体积的磷酸缓冲液(10mM,pH 7.4)和醋酸缓冲液(0.1M,pH 4.0)交替洗涤3次,得到共价偶联了抗IgG Fc段单域重链抗体的免疫亲和吸附材料。

[0066] 固相载体材料不限于琼脂糖凝胶,也可以选用硅球、纳米磁珠等。

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

Ala Thr Ala Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val
 35 40 45

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Asn Glu Arg Pro Gly Trp Val Thr Leu Ile Lys Tyr Tyr Pro
 100 105 110

[0002]

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 引物

<400> 3

cttggtggtc ctggctgc

18

<210> 4

<211> 49

<212> DNA

<213> 引物

<220>

<221> misc_feature
 <222> (44)..(44)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (47)..(47)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 4
 tcgcggecca gccggccatg gccagktgc agctcgtgga gtcngngg 49

<210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 引物

<400> 5
 cgagtgcggc cgcggggtct tcgctgtggt gcg 33

[0003]

<210> 6
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 引物

<400> 6
 cgagtgcggc cgcttgtggt ttggtgtct tggg 34

<210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 引物

<400> 7
 ggtacgtgct gttgaactgt tcc 23

<210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 引物

	<400> 8	
	agcggataac aatttcacac agga	24
	<210> 9	
[0004]	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 引物	
	<400> 9	
	gcccattca gatcctcttc	20

专利名称(译)	一种免疫库来源的结合免疫球蛋白Fc段的纳米抗体		
公开(公告)号	CN106117350A	公开(公告)日	2016-11-16
申请号	CN201610530405.5	申请日	2016-07-07
[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	付金衡 周鹏 涂追 许杨		
发明人	付金衡 周鹏 涂追 许杨		
IPC分类号	C07K16/00 C12N15/13 C07K1/22 G01N33/68 G01N33/53 B01J20/24 B01J20/281 B01J20/30 B01D15/38		
CPC分类号	C07K16/005 B01D15/3804 B01J20/24 B01J20/281 B82Y30/00 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/569 G01N33/53 G01N33/6854		
代理人(译)	刘华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于基因工程领域，具体为针对免疫球蛋白Fc段的单域重链抗体，其具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列，可用于免疫检测、抗原富集纯化等领域。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，能够获得性质(亲和性、特异性、稳定性等)更好的突变体，用来发展进一步用于医药、工业、农业的蛋白质或多肽。

引物名称	序列
AlpVh-LD	5' - CTTGGTGGTCCTGGCTGC - 3'
AlpVh-SfiI	5' - <u>tcgcccagccggccatggcc</u> CAGTGCAGCTCGTGGAGTCNGGNGG- 3'
AlpVHHR1-NotI	5' - cgagt <u>gcggccgc</u> GGGGTCTTCGCTGTGGTGGC - 3'
AlpVHHR2-NotI	5' - cgagt <u>gcggccgc</u> TTGTGTTTTGGTGTCTTGGG - 3'
CH ₂ -R	5' - GGTACCTGCTGTTGAACTGTTCC - 3'
M13-R	5' - AGCGGATAACAATTCACACAGGA - 3'
pHEN-R	5' - GCCCATTCAGATCCTCTTC - 3'