



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101955542 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 26

(21) 申请号 201010165204. 2 *C12N 1/15* (2006. 01)  
(22) 申请日 2010. 05. 06 *C12N 1/19* (2006. 01)  
(71) 申请人 北京维德维康生物技术有限公司 *C12N 1/21* (2006. 01)  
地址 100085 北京市海淀区上地开拓路 5 号 *C12N 5/10* (2006. 01)  
中关村生物医药园 B 区 421 室 *G01N 33/53* (2006. 01)  
*G01N 33/577* (2006. 01)  
(72) 发明人 沈建忠 江海洋 吴小平 李杰超  
王战辉 徐飞 刘丹 杨光 李娜  
杨丽丽 王富伟 王进  
(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司  
公司 11245  
代理人 关畅 任风华  
(51) Int. Cl.  
*C07K 16/44* (2006. 01)  
*C12N 15/13* (2006. 01)  
*C12N 15/63* (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页 序列表 2 页  
附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测腐马素的免疫试剂盒及其专用抗体

(57) 摘要

本发明公开了一种检测腐马素的免疫试剂盒及其专用抗体。该单链抗体由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成, 所述重链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 端起第 1-118 位氨基酸残基所示, 所述轻链可变区的的氨基酸序列如序列 1 自 N 端起第 134-246 位氨基酸残基所示。本发明抗体的亲和常数为  $1.73 \times 10^9 \text{L/mol}$ 、半数抑制量 ( $IC_{50}$ ) 0.15ng/mL。本发明为食品中腐马素残留检测方法的建立提供高效价、高特异性的抗体来源。本发明试剂盒的灵敏度高、准确度高、精密度高、对腐马素 B1 的特异性好, 成本低廉。因此, 本发明的抗体及试剂盒及检测方法在腐马素 B1 的检测中将发挥重大作用。

1. 一种单链抗体,由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成,所述重链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 1-118 位氨基酸残基所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 134-246 位氨基酸残基所示。

2. 根据权利要求 1 所述的单链抗体,其特征在于:所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 119-133 位氨基酸残基所示。

3. 权利要求 1 或 2 所述单链抗体的编码基因。

4. 根据权利要求 3 所述的编码基因,其特征在于:所述编码基因为如下 1)、2)、3)、4) 或 5) 所示:

1) 所述重链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 1-354 位核苷酸所示的 DNA 分子;

2) 所述轻链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 400-738 位核苷酸所示的 DNA 分子;

3) 所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 355-399 位核苷酸所示的 DNA 分子;

4) 序列表中序列 2 所示的 DNA 分子;

5) 在严格条件下与 1)、2) 或 3) 或 4) DNA 序列杂交且具有相同功能的 DNA 分子。

5. 含有权利要求 3 或 4 所述编码基因的重组载体、重组菌、转基因细胞系和表达盒。

6. 权利要求 1 或 2 所述单链抗体在检测腐马素中的应用或权利要求 1 或 2 所述单链抗体在检测腐马素 B1 中的应用。

7. 一种检测腐马素的免疫试剂盒,为下述 1)、2)、3) 或 4) 中任一所述试剂盒:

1) 试剂盒中包括腐马素半抗原与载体蛋白的偶联物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体和酶标记抗体;其中,所述偶联物作为包被原;

2) 试剂盒中包括腐马素半抗原的酶标记物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体和抗抗体;其中,所述抗抗体作为包被原;

3) 试剂盒中包括腐马素半抗原的酶标记物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体;其中,权利要求 1 或 2 所述单链抗体作为包被原;

4) 试剂盒中包括腐马素半抗原与载体蛋白的偶联物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体的酶标记物;其中,所述偶联物作为包被原。

8. 根据权利要求 7 所述的免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中包括腐马素标准品溶液、洗涤液和样品浓缩液;所述腐马素标准品为腐马素 B1;

所述腐马素标准品溶液为如下各浓度的溶液:0ng/L、50ng/L、150ng/L、450ng/L、1350ng/L 和 4050ng/L;

每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的:将 10ml 吐温 20, 5g 叠氮化钠和 990ml 磷酸盐缓冲液混合,得到所述洗涤液;所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.005M-0.015M,具体为 0.01M, pH 值为 7.2-7.6,具体为 7.4;

所述样品浓缩液为浓度为 0.03mol/L-0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液,具体为 0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的免疫试剂盒,其特征在于:

所述腐马素半抗原与载体蛋白的偶联物是按照如下方法制备的:将每 5mg 腐马素半抗

原溶于 0.1M 盐酸水溶液中,并预冷至 0℃,加入 10mg  $\text{NaNO}_2$ ,4℃条件下搅拌 5h,得到的溶液记作溶液 I ;20mg 载体蛋白溶于 0.1M 磷酸盐缓冲溶液中,得到的溶液记作溶液 II ;将溶液 II 加到溶液 I 中,4℃条件下搅拌 6h,即得到所述腐马素半抗原与载体蛋白的偶联物;

所述腐马素半抗原为腐马素 B1 ;所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、兔血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白;

所述抗体为鼠抗 HIS 标签单克隆抗体。

10. 一种检测腐马素 B1 的方法,包括如下步骤:

1) 将待测样品进行前处理,得到待测样本溶液;

2) 用权利要求 7-9 中任一所述免疫试剂盒对所述待测样本溶液进行检测;

所述前处理的方法为下述 a)、b) 和 c) 中的任一:

a) 所述待测样品为谷物或饲料样品 ;将每 1g 述待测样品与 0.25g 氯化钠和 5mL

70% (v/v) 的甲醇水溶液混合,震荡 3min,过滤,取滤液 200  $\mu\text{L}$  加入 1800  $\mu\text{L}$  1% (m/m) 氯化钠水溶液,混匀后即得到待测样本溶液;

b) 所述待测样品为牛奶 ;将每 0.5mL 牛奶与 2mL 样品稀释液混匀,25℃、4000r/min 离心 10min,取上清液,即得到待测样本溶液;

c) 所述待测样品为猪肉、牛肉、羊肉或鸡肉 ;将每 3g 所述待测样品的匀浆组织与 15mL pH 值为 6.9 的 PBS 缓冲液混匀,200r/min 震荡 30min,4000r/min 离心 10min,取上清液,即得到待测样本溶液;

所述样品稀释液为将所述样品浓缩液稀释 20 倍得到的。

## 一种检测腐马素的免疫试剂盒及其专用抗体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测腐马素的免疫试剂盒及其专用抗体。

### 背景技术

[0002] 腐马素 (Fumonisin, FB) 是由串珠镰刀菌产生的结构相关的一组真菌毒素。腐马素大多存在于玉米及玉米制品中,其含量一般超过 1mg/kg,在大米、面条、调味品、高粱、啤酒中、芦笋中也有较低浓度的腐马素存在。腐马素的化学结构与神经鞘氨醇很相似,能特异性地干扰神经鞘氨醇在体内的代谢,进而能够引起马脑白质软化症、猪肺水肿、羊的肾病变等疾病。一些试验表明玉米中腐马素的含量与人类食管癌的发生率之间存在着平行对应关系。国际癌症研究 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 把腐马素划分到 2B 组,即人类可能的致癌物。腐马素污染食品及饲料后对人类及动物的健康造成很大的威胁。

[0003] 目前,用于腐马素的检测方法主要有化学检测方法和免疫学检测方法。化学检测方法主要包括高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱法 (GC)、液相色谱-质谱法 (LC-MS/MS) 和气相色谱-质谱法 (GC-MS) 法,但前处理过程复杂,需要比较昂贵的仪器,且分析速度慢,因此不适于大量样品的快速检测分析。免疫分析方法因其高灵敏度、高通量及检测所需时间较少而日益受到研究人员的青睐。在免疫分析方法中,酶联免疫分析方法 (ELISA) 在农药残留检测方面得到了最广泛的应用。但在一些实际样品检测中,酶联免疫分析方法对部分农药在样品中的最低检测限仍达不到其 MRL 值要求。化学发光免疫检测技术不同于酶联免疫吸附分析法,它是化学发光法和免疫分析法结合的产物,同时具有化学发光检测技术的高灵敏性和免疫分析技术的高特异性。化学发光免疫分析法的基本原理与 ELISA 相似,不同之处在于酶标记物的反应体系是化学发光反应。

[0004] 目前,用于免疫检测的抗体都是单克隆抗体或多克隆抗体。单克隆抗体或多克隆抗体的制备必须通过细胞培养获得,整个生产过程复杂,消耗时间长,费用高,且不易进行操作。单链抗体是将抗体重链可变区和轻链可变区基因通过一个短肽链连接后融合表达出来的抗体片断,具有分子量小、特异性高、结合力强、易于利用基因工程技术操作等优点。

### 发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种单链抗体及其编码基因。

[0006] 本发明所提供的单链抗体,由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成,所述重链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 1-118 位氨基酸残基所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 134-246 位氨基酸残基所示。

[0007] 上述单链抗体中,所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 119-133 位氨基酸残基所示。

[0008] 所述编码基因为如下 1)、2)、3)、4) 或 5) 所示:

[0009] 1) 所述重链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 1-354 位核苷酸所示的 DNA 分子；

[0010] 2) 所述轻链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 400-738 位核苷酸所示的 DNA 分子；

[0011] 3) 所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 355-399 位核苷酸所示的 DNA 分子；

[0012] 4) 序列表中序列 2 所示的 DNA 分子；

[0013] 5) 在严格条件下与 1)、2) 或 3) 或 4) DNA 序列杂交且具有相同功能的 DNA 分子。

[0014] 含有上述任一所述编码基因的重组载体、重组菌、转基因细胞系和表达盒也属于本发明的保护范围。

[0015] 上述任一所述单链抗体在检测腐马素中的应用或上述任一所述单链抗体在检测腐马素 B1 中的应用也属于本发明的保护范围。

[0016] 本发明的另一个目的是提供一种检测腐马素的免疫试剂盒。

[0017] 本发明所提供的检测腐马素的免疫试剂盒,为下述 1)、2)、3) 或 4) 中任一所述试剂盒：

[0018] 1) 试剂盒中包括腐马素半抗原与载体蛋白的偶联物、上述任一所述单链抗体和酶标记抗体；其中,所述偶联物作为包被原；

[0019] 2) 试剂盒中包括腐马素半抗原的酶标记物、上述任一所述单链抗体和抗体；其中,所述抗体作为包被原；

[0020] 3) 试剂盒中包括腐马素半抗原的酶标记物、上述任一所述单链抗体；其中,所述单链抗体作为包被原；

[0021] 4) 试剂盒中包括腐马素半抗原与载体蛋白的偶联物、上述任一所述单链抗体的酶标记物；其中,所述偶联物作为包被原。

[0022] 上述任一所述免疫试剂盒中,所述试剂盒中包括腐马素标准品溶液、洗涤液和样品浓缩液；所述腐马素标准品为腐马素 B1；

[0023] 所述腐马素标准品溶液为如下各浓度的溶液：0ng/L、50ng/L、150ng/L、450ng/L、1350ng/L 和 4050ng/L；

[0024] 每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的：将 10ml 吐温 20, 5g 叠氮化钠和 990ml 磷酸盐缓冲液混合,得到所述洗涤液；所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.005M-0.015M, 具体为 0.01M, pH 值为 7.2-7.6, 具体为 7.4；

[0025] 所述样品浓缩液为浓度为 0.03mol/L-0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液, 具体为 0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0026] 上述任一所述免疫试剂盒中,所述腐马素半抗原与载体蛋白的偶联物是按照如下方法制备的：将每 5mg 腐马素 B1 半抗原溶于 0.1M 盐酸水溶液中,并预冷至 0℃,加入 10mg  $\text{NaNO}_2$ , 4℃ 条件下搅拌 5h,得到的溶液记作溶液 I；20mg 载体蛋白溶于 0.1M 磷酸盐缓冲溶液中,得到的溶液记作溶液 II；将溶液 II 加到溶液 I 中,4℃ 条件下搅拌 6h,即得到所述腐马素半抗原与载体蛋白的偶联物；

[0027] 所述腐马素半抗原为腐马素 B<sub>1</sub>；所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、兔血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白；

- [0028] 所述抗体为鼠抗 HIS 标签单克隆抗体。
- [0029] 本发明的另一个目的是提供一种检测腐马素 B1 的方法。
- [0030] 本发明所提供的检测腐马素 B1 的方法,包括如下步骤:
- [0031] 1) 将待测样品进行前处理,得到待测样本溶液;
- [0032] 2) 用上述任一所述免疫试剂盒对所述待测样本溶液进行检测;
- [0033] 所述前处理的方法为下述 a)、b) 和 c) 中的任一:
- [0034] a) 所述待测样品为谷物或饲料样品;将每 1g 所述待测样品与 0.25g 氯化钠和 5mL70% (v/v) 的甲醇水溶液混合,震荡 3min,过滤,取滤液 200  $\mu$ L 加入 1800  $\mu$ L 1% (m/m) 氯化钠水溶液,混匀后即得到待测样本溶液;
- [0035] b) 所述待测样品为牛奶;将每 0.5mL 牛奶与 2mL 样品稀释液混匀,25 $^{\circ}$ C、4000r/min 离心 10min,取上清液,即得到待测样本溶液;
- [0036] c) 所述待测样品为猪肉、牛肉、羊肉或鸡肉;将每 3g 所述待测样品的匀浆组织与 15mL pH 值为 6.9 的 PBS 缓冲液混匀,200r/min 震荡 30min,4000r/min 离心 10min,取上清液,即得到待测样本溶液;
- [0037] 所述样品稀释液为将所述样品浓缩液稀释 20 倍得到的。
- [0038] 所述腐马素半抗原与载体蛋白的偶联原理为:用重氮化法将半抗原 FB1 偶联于载体蛋白 OVA 上,由于 FB1 具有芳伯氨基的半抗原,在强酸和冷却条件下芳伯氨基生成亲电重氮盐,与载体蛋白中的强给电子集团发生反应,生成重氮产物,形成包被抗原 FB1-OVA。
- [0039] 上述试剂盒既可以为酶联免疫试剂盒,又可为发光免疫试剂盒,当为发光免疫试剂盒时,试剂盒中还包括底物显色液;所述底物显色液由 A 液和 B 液组成;A 液由 (1) 中所述物质(即发光剂)中的至少一种和 (2) 中所述物质(即发光增强剂)中的至少一种组成:(1) 鲁米诺、异鲁米诺和 4-氨基己基-N-乙基异鲁米诺,(2) 对-碘苯酚、邻-碘苯酚和对甲苯酚;B 液为过氧化氢溶液或尿素过氧化氢溶液。所述发光底物液分为 A 液和 B 液保存,在临用前按 1:1 混合使用。
- [0040] 上述试剂盒的检测原理如下:
- [0041] 当在酶标板微孔条上预包被腐马素半抗原与载体蛋白的偶联物时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入腐马素单链抗体溶液,样本中残留的腐马素或腐马素标准品与酶标板上包被的腐马素半抗原与载体蛋白的偶联物竞争腐马素单链抗体,加入酶标记二抗进行放大作用,催化底物发光,样本发光强度值与样本中腐马素的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中腐马素的含量。
- [0042] 当在酶标板微孔条上预包被二抗时,加入腐马素单链抗体孵育后,加入样本溶液或标准品溶液,再加入酶标记腐马素半抗原溶液,样本中的腐马素或腐马素标准品与酶标记腐马素半抗原竞争腐马素特异性抗体,用催化底物发光,样本发光强度值与样本中腐马素的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中腐马素的含量。
- [0043] 当在酶标板微孔条上预包被腐马素单链抗体时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记腐马素半抗原溶液,样本中残留的腐马素或腐马素标准品与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的腐马素单链抗体,用催化底物发光,样本发光强度值与腐马素的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中腐马素的含量。
- [0044] 当在酶标板微孔条上预包被腐马素半抗原与载体蛋白的偶联物时,加入样本溶液

或标准品溶液后,再加入酶标记腐马素单链抗体溶液,样本中的腐马素或腐马素标准品与酶标板上包被的腐马素抗原竞争腐马素单链抗体,用催化底物发光,样本发光强度值与样本中腐马素的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中腐马素的含量。

[0045] 本发明提供的试剂盒检测方法为:

[0046] 当包被原为腐马素偶联抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入抗体,温育后洗涤拍干,再加入酶标二抗,温育后洗涤拍干,催化底物发光、用化学发光检测仪测定发光强度值;

[0047] 当包被原为腐马素偶联抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记抗体,温育后洗涤拍干,催化底物发光、用化学发光检测仪测定发光强度值;

[0048] 当包被原为腐马素单链抗体时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记腐马素半抗原,温育后洗涤拍干,催化底物发光、用化学发光检测仪测定发光强度值;

[0049] 当包被原为二抗时,向酶标板微孔中加入腐马素单链抗体,温育后洗涤拍干,再加入标准品溶液或样品溶液后加入酶标腐马素半抗原,温育后洗涤拍干,催化底物发光、用化学发光检测仪测定发光强度值。

[0050] 本发明提供的检测结果分析过程为:

[0051] 以所获得的样品发光强度(B)与第一个标准(0标准)的发光强度( $B_0$ )的比值( $B/B_0$ )为纵坐标,以FB标准品浓度为横坐标,通过专业分析软件绘制标准曲线,并求出 $IC_{50}$ ,以20%的抑制作为最低检测限。

[0052] 本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法,计算出样品溶液浓度。

[0053] 本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件,此法更便于大量样品的快速分析,整个检测过程只需较短时间,1.5h内即可以完成。

[0054] 本发明的单链抗体(scFv)是用基因工程方法将抗体重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)通过一段连接肽(Linker)连接而成的重组抗体,是保持了亲本抗体的抗原亲和活性和特异性的最小功能性抗体片段,可通过基因工程技术体外表达得到,可在细菌中很经济地大规模生产,从而使得免疫检测抗体的生产变得非常容易、简便和经济,进而大大减少检测试剂的费用,比杂交瘤细胞培养得到单抗的方法要简单得多。本发明抗体的亲和常数为 $1.73 \times 10^9 L/mol$ 、半数抑制量( $IC_{50}$ )为0.15ng/mL。本发明为食品中腐马素残留检测方法的建立提供高效价、高特异性的抗体来源。

[0055] 标准品精密度试验中,本发明试剂盒的每批试剂盒各测定10次标准品变异系数在5.3%~8.2%之间;样本准确度和精密度实验中,玉米样品的添加回收率为81.3%~91.3%;牛奶样品的添加回收率为86.2%~102.6%。玉米样品的批内变异系数为6.1%~8.1%,批间变异系数为8.8%~11.9%;牛奶样品的批内变异系数为6.7%~8.9%,批间变异系数为8.4%~10.9%。交叉反应检测实验中,本发明试剂盒对腐马素B1的特异性好。综上所述,本发明试剂盒的灵敏度高、准确度高、精密度高、对腐马素B1的特异性好。另外,本发明试剂盒成本低廉。用本发明的试剂盒检测样品中腐马素B1的含量,具有操作简便快捷、样品前处理简单的特点,能同时快速检测大批量样品,可实现现场高通量快速检测。因此,本发明的抗体及试剂盒及检测方法在腐马素B1的检测中将发挥重大作用。

## 附图说明

[0056] 图 1 为试剂盒的标准曲线。

## 具体实施方式

[0057] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0058] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0059] 实施例 1、抗体的制备及功能检测

[0060] 一、腐马素单链抗体的制备

[0061] (一) 抗体的筛选

[0062] 取 6 个月雄性 Balb/c 小鼠, Trizol 一步法提取脾细胞总 RNA, 纯化得到 mRNA, 再逆转录得到 cDNA。使用全套引物, 以 cDNA 为模板分别扩增得到重链可变区 (VH)、轻链可变区 (VL) 基因, 经叠加延伸聚合酶链式反应 (Overlap-PCR) 将 VH、VL 基因随机拼接为单链抗体基因 (ScFv), 然后将 ScFv 与载体 pCANTAB5E 连接得 pCANTAB5E/ScFv, 并转化大肠杆菌 TG1, 即得到鼠源非免疫单链抗体库。用 ELISA 方法筛选得到带有特异性的抗腐马素的单链抗体的噬菌体颗粒, 通过测序得到该抗体的核苷酸序列。

[0063] 该单链抗体的编码基因序列如序列表中序列 2 所示, 自序列 2 的 5' 末端起第 1-354 位核苷酸编码重链可变区, 自序列 2 的 5' 末端起第 400-738 位核苷酸编码轻链可变区, 自序列 2 的 5' 末端起第 355-399 位核苷酸编码短肽。

[0064] 该单链抗体由重链可变区、连接所述重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区顺次连接组成。该抗体的氨基酸序列如序列表中序列 1 所示, 自序列 1 的 N 端起第 1-118 位氨基酸残基为重链可变区的氨基酸序列, 自序列 1 的 N 端起第 134-246 位氨基酸残基为轻链可变区的氨基酸序列, 自序列 1 的 N 端起第 119-133 位氨基酸残基为短肽序列。

[0065] (二) 抗体的制备

[0066] 表达载体 pET20b 购自德国 NOVAGEN 公司; 大肠杆菌 BL21 购自德国 NOVAGEN 公司; 蛋白纯化用 HisLink™ Protein Purification Resin 购自美国 Promega 公司, 产品目录号为 V8823。

[0067] 合成序列表中序列 2 所示基因, 并在两端引入酶切位点 Xba I 和 Not I, 用限制性内切酶 Xba I 和 Not I 酶切, 回收目的基因片段; 用限制性内切酶 Xba I 和 Not I 酶切表达载体 pET20b, 回收载体大片段; 连接, 连接产物转化大肠杆菌, 筛选培养, 挑取单克隆; 将单克隆接入液体培养基进一步培养, 提取质粒, 酶切和测序验证, 结果测得的序列如序列表中序列 2 所示, 表明重组载体中基因插入方向和序列均正确, 将阳性重组载体记作重组表达载体 pET20b/ScFv。

[0068] 采用电击转化法重组表达载体 pET20b/ScFv 转化大肠杆菌 BL21, 抗性筛选, 经菌液 PCR 及质粒酶切验证, 得到含有重组表达载体 pET20b/ScFv 的重组大肠杆菌, 记作重组大肠杆菌 BL21/pET20b/ScFv。

[0069] 2×TY 培养液的组成: 由胰蛋白胨、酵母提取物、NaCl 和水组成, 每 1 升 2×TY 培养液中胰蛋白胨的浓度为 1.6%、酵母提取物的浓度为 1%、NaCl 的浓度为 0.5%; 各百分含量均为质量百分含量。

[0070] 含氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖的 2×TY 培养液是按照如下方法得到的: 向 2×TY

培养液中添加氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖,使氨苄青霉素在溶液中的终浓度为  $100 \mu\text{g/ml}$ ,使氯霉素在溶液中的终浓度为  $34 \mu\text{g/ml}$ ,使葡萄糖在溶液中的终浓度为 1% (质量百分含量)。

[0071] 发酵重组菌:将重组大肠杆菌 BL21/pET20b/ScFv 的单个阳性菌落接种至含氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖的  $2 \times \text{TY}$  培养液中,  $37^\circ\text{C}$  振摇,至培养体系的  $A_{600}$  为 0.6 时,收集细菌;将细菌重悬于 2ml LB 液体培养基中,按 1 : 20 的体积比将菌悬液接种至 50ml 含相同浓度抗生素的 LB 液体培养基中 (含相同浓度抗生素的 LB 液体培养基的组成:氨苄青霉素、氯霉素、酵母提取物、蛋白胨、NaCl 和水组成;溶液中各成分的浓度为:酵母提取物 0.5%,蛋白胨 1%,NaCl 1%,氨苄青霉素  $100 \mu\text{g/ml}$ ,氯霉素  $34 \mu\text{g/ml}$ ),  $37^\circ\text{C}$  振摇,至培养体系的  $A_{600}$  为 0.6 时,加 IPTG ( $0.7\text{mmol/L}$ ) 诱导,  $30^\circ\text{C}$  振摇 2.5h,在  $4^\circ\text{C}$  下  $5000\text{r/min}$  离心 10min,收获细菌。用洗涤液 (将 20mmol Tris 和 0.15mol NaCl 用水溶解,用 HCL 调 PH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升洗涤液) 洗涤 1 次,加溶菌液 (将 20mmol Tris、10ml Triton X-100、 $250 \mu\text{mol}$  PMSF、 $62.5 \times 10^4\text{U}$  溶菌酶用水溶解,用 HCL 调 PH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升溶菌液),  $30^\circ\text{C}$  放置 15min,然后在冰上超声处理 (输出功率 80%) 10s,停 10s,反复 3 次,至细胞不再粘稠。在  $4^\circ\text{C}$   $2000 \times g$  离心 20min,分别收集上清及沉淀。将沉淀用结合缓冲液 I (将 20mmol Tris、0.5mol NaCl 和 5mmol 咪唑用水溶解,用 HCL 调 PH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升结合缓冲液 I) 洗涤一次,而后,悬于结合缓冲液 II (将 20mmol Tris、0.5mol NaCl、5mmol 咪唑和 6mol 尿素用水溶解,用 HCL 调 PH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升结合缓冲液 II) 中,  $4^\circ\text{C}$ ,  $12000 \times g$  离心 20min,收集上清,经 0.45mm 滤膜过滤,收集滤液,得到抗体的粗制液。

[0072] 纯化:利用表达载体上带有的组氨酸标签 (His-tag) 标记通过亲和层析纯化单链抗体蛋白。将 HisLink™ Protein Purification Resin 装柱,以 10 倍柱体积的 binding buffer (将 100mmol HEPES、10mmol 咪唑和 500mmol NaCl 用水溶解,再调节 pH 值至 7.5,然后用水定容至 1 升,得到 1 升 binding buffer) 平衡纯化柱,取抗体的粗制液上样,然后用 5 倍柱体积的 wash buffer (将 100mmol HEPES、100mmol 咪唑和用水溶解,再调节 pH 值至 7.5,然后用水定容至 1 升,得到 1 升 wash buffer) 洗脱杂蛋白,最后用 10 倍柱体积的 elution buffer (将 100mmol HEPES、250mmol 咪唑用水溶解,再调节 pH 值至 7.5,然后用水定容至 1 升,得到 1 升 elution buffer) 洗脱目标蛋白,收集洗脱液,透析,得到纯化的抗体。

[0073] 蛋白验证 Western blot:收集上述各阶段产物,进行 12% SDS-PAGE 电泳;将电泳条带印迹到 NC 膜上,再与 HRP 标记的腐马素 B1 杂交,检测发光条带。腐马素 B1 购自美国 Sigma-Aldrich 公司,产品目录号为 32936。

[0074] 同时以转入空载体 pET20b 的大肠杆菌 BL21 作为对照,并按照上述方法进行表达和纯化,和 Western blot 检测。

[0075] Western blot 检测结果表明:1) 实验组得到的蛋白具有与腐马素 B1 结合的功能,蛋白的分子量为 28kD,与预期的蛋白分子量一致,表明目的蛋白为与腐马素 B1 结合的抗体。2) 对照组没有检测到任何与腐马素 B1 结合的蛋白条带。

[0076] (三) 抗体的功能检测

[0077] 1、用 ELISA 方法,检测抗体的半抑制率 ( $\text{IC}_{50}$ ):

[0078] a、将实施例 2 中制备得到的偶联物 ( $\text{FB}_1\text{-OVA}$ ) 用包被缓冲液溶解,得到  $\text{FB}_1\text{-OVA}$  的

溶液（该溶液中  $FB_1$ -OVA 的浓度为  $1 \mu\text{g/ml}$ ）。包被缓冲液：pH9.6、0.1mol/L 的碳酸钠缓冲液。

[0079] 向 96 孔板的孔中加入  $FB_1$ -OVA 的溶液， $100 \mu\text{L}$  每孔， $37^\circ\text{C}$  温育 2h；倾去包被液，用 PBST 溶液（PBS+0.05% Tween20）洗涤 3 次， $250 \mu\text{L}$  每孔，每次 30s，甩干孔中液体；

[0080] b、然后向每孔中加入  $200 \mu\text{L}$  2% BSA 封闭液， $37^\circ\text{C}$  温育 2h，倾去孔内液体；用 PBST 溶液（PBS+0.05% Tween20）洗涤 3 次， $250 \mu\text{L}$  每孔，每次 30s，甩干孔中液体。

[0081] c、向孔中加入单链抗体溶液和不同浓度的腐马素 B1 标准品溶液，各  $50 \mu\text{L}$  每孔， $37^\circ\text{C}$  孵育 1 小时。以只加入单链抗体溶液不加入腐马素 B1 标准品溶液的孔作阳性对照。

[0082] 单链抗体溶液的制备：用样品稀释液稀释实验（二）中的纯化抗体得到溶液，抗体在溶液中的浓度为  $5\text{ng/mL}$ ；样品稀释液为  $0.002\text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液。

[0083] 不同浓度的腐马素 B1 溶液的制备：用样品稀释液稀释腐马素 B1 得到溶液。

[0084] d、用 PBST 溶液（PBS, 0.05% Tween20）洗涤 3 次， $250 \mu\text{L}$  每孔，甩干孔中液体，加入 HRP 标记的鼠抗 His 标签单克隆抗体， $37^\circ\text{C}$  孵育 1 小时；

[0085] e、用 PBST 溶液（PBS, 0.05% Tween20）洗涤 3 次， $250 \mu\text{L}$  每孔；加入 TMB 显色， $37^\circ\text{C}$  反应 10 分钟，加入 2M 硫酸终止显色反应，每孔  $50 \mu\text{L}$ ，使用酶标仪进行读数。

[0086] 实验设 3 次重复。

[0087] 结果如下：

[0088] 1) 吸光度值与每孔所加入的标准品溶液中  $FB_1$  的浓度成反比；证明，所表达纯化得到的单链抗体具有针对腐马素 B1 的结合特异性，并呈现线性关系，说明该抗体可用于对腐马素 B1 的免疫检测。

[0089] 2) 半抑制率 ( $IC_{50}$ )：阳性对照孔（即不添加腐马素 B1 标准品溶液的孔）的吸光度值为  $B_0$ ，各实验孔的吸光度值为  $B$ ，当  $B/B_0$  为 50% 时所对应的腐马素 B1 标准品溶液的浓度即为半抑制率 ( $IC_{50}$ )。该单抗的半抑制率 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.15\text{ng/mL}$ 。

[0090] 2、抗体的亲和常数测定

[0091] 方法：取定量的一定稀释度的抗体，分别加入逐渐增加的抗原里，可使抗体的结合达到饱和，以结合部分 ( $B$ ) 为纵坐标，抗原浓度 ( $\text{mol/L}$ ) 为横坐标绘制饱和曲线，求出抗体饱和程度为 50% 时的游离抗原浓度，其倒数即为该抗体在此稀释度下的亲和常数。

[0092] 结果：抗体的亲和常数为  $1.73 \times 10^9 \text{L/mol}$ 。

[0093] 实施例 2、化学发光免疫分析试剂盒及其制备与应用

[0094] 一、化学发光免疫分析试剂盒由下述物质组成：

[0095] 1、包被腐马素半抗原与载体蛋白偶联物的酶标板；

[0096] 2、腐马素单链抗体：实施例 1 中所述抗体。抗体工作液的浓度为  $5\text{ng/mL}$ ，抗体工作液是用样品稀释液稀释实施例 1 中的纯化抗体得到的；

[0097] 3、腐马素标准品：标准品溶液浓度分别为  $0\text{ng/L}$ 、 $50\text{ng/L}$ 、 $150\text{ng/L}$ 、 $450\text{ng/L}$ 、 $1350\text{ng/L}$  和  $4050\text{ng/L}$ ；腐马素标准品为腐马素 B1 (Fumonisin B1)，购自 Sigma-Aldrich 公司，产品目录号为 32936；用样品稀释液稀释成上述各浓度；

[0098] 4、酶标二抗：辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗 HIS 标签单克隆抗体；购自美国 Sigma-Aldrich 公司，产品目录号为 A7058。

[0099] 5、底物显色液：由 A 液和 B 液组成，A 液为鲁米诺与对 - 碘苯酚混合溶液，B 液为

过氧化氢水溶液；在该发光体系中加入增强剂对-碘苯酚可增加化学发光强度，并在较长时间保持稳定，从而大大提高免疫分析的灵敏度。所述发光底物液分为 A 液和 B 液保存，在临用前按 1 : 1 混合使用。

[0100] 6、洗涤液：每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的：将 10ml 吐温 20、5g 叠氮化钠和 990ml 磷酸盐缓冲液混合，得到所述洗涤液；所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01M，pH 值为 7.4；

[0101] 7、样品浓缩液：0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液；将其进行 20 倍稀释，成为样品稀释液后使用。

[0102] 二、试剂盒的制备

[0103] 半抗原腐马素 B1 (Fumonisin B1, 简称 FB<sub>1</sub>) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司，产品目录号为 32936；

[0104] 1、包被原及其制备

[0105] 用重氮化法将半抗原 FB<sub>1</sub> 偶联于载体蛋白 OVA 上，由于 FB<sub>1</sub> 具有芳伯氨基的半抗原，在强酸和冷却条件下芳伯氨基生成亲电重氮盐，与载体蛋白中的强给电子基团发生反应，生成重氮产物，形成包被抗原 FB<sub>1</sub>-OVA。制备过程如下：取 5mg 腐马素 B1 溶于 0.1M 盐酸水溶液中，并预冷至 0℃，加入 10mg NaNO<sub>2</sub>，4℃ 条件下搅拌 5h，得到的溶液记作溶液 I；20mg OVA 溶于 0.1M 磷酸盐缓冲溶液中，得到的溶液记作溶液 II；将溶液 II 加到溶液 I 中，4℃ 条件下搅拌 6h，即得到所述腐马素半抗原与载体蛋白的偶联物；用葡聚糖凝胶 G-25 进行纯化后，测包被原的浓度，存于 4℃ 备用。半抗原 FB<sub>1</sub> 与载体蛋白 OVA 的偶联比为 1 : 11。

[0106] 2、包被有包被原的酶标板及其制备

[0107] 用包被缓冲液将步骤 1 制得的腐马素 B1 与载体蛋白的偶联物稀释成 5.0 μg/mL，每孔加入 100 μL，37℃ 温育 2h，倾去包被液，用洗涤液稀释 20 倍后洗涤 3 次，每次 30s，拍干，然后在每孔中加入 200 μL 封闭液，37℃ 温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0108] 包被缓冲液：pH9.6、0.05mol/L 的碳酸钠缓冲液；

[0109] 封闭液：每 1 升封闭液按照如下方法配制：将 5ml 马血清、1g 叠氮化钠、30g 酪蛋白混合，用磷酸盐缓冲液溶解并定容至 1000ml，得到封闭液；其中，磷酸盐缓冲液的浓度为 0.02M，pH 值为 7.2。

[0110] 三、试剂盒检测方法

[0111] (一) 样品前处理

[0112] (1) 谷物、饲料样品处理：将样品粉碎，称取 1g 置于 20mL 的试管中，加入 0.25g 氯化钠和 5mL 70% (v/v) 的甲醇水溶液，强力震荡 3min，过滤，取滤液 200 μL 加入 1800 μL 1% (m/m) 氯化钠水溶液，混匀后即得到检测样本溶液，取 50 μL 用于检测。

[0113] (2) 牛奶样品处理：取牛奶 0.5mL，加入样品稀释液 2mL，充分混匀，室温 4000r/min 离心 10min，上清液即为检测样本溶液，取 50 μL 上清液用于检测。

[0114] (3) 肉类样品的处理（包括猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉等）：将样品匀浆，称取 3g 加入 15mL PBS 缓冲液 (pH 6.9)，200r/min 震荡 30min，然后 4000r/min 离心 10min，上清液即为检测样本溶液，取 50 μL 上清液用于检测。

[0115] (二) 用试剂盒检测

## [0116] 1、标准曲线的制作

[0117] 向包被有包被原的酶标板微孔中加入腐马素标准品溶液 50  $\mu$  L, 再加入腐马素单链抗体工作液 50  $\mu$  L, 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 每孔加入 250  $\mu$  L 洗涤液, 30s 后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 5 次, 用吸水纸拍干。加入辣根过氧化物酶标记的抗 His 抗体工作液 100  $\mu$  L, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 重复洗涤步骤, 加入底物显色液用化学发光检测仪进行测定。

[0118] 用每个浓度的标准品溶液的发光强度平均值 (B) 与第一个标准品溶液 (0 标准) 的发光强度值 ( $B_0$ ) 的比值 ( $B/B_0$ ) 作为纵坐标, 以 FB1 标准品浓度 (ng/L) 的浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得到的标准曲线如图 1 所示。

## [0119] 2、样品中腐马素浓度的测定

[0120] 向包被有包被原的酶标板微孔中加入检测样本溶液 50  $\mu$  L, 再加入腐马素单链抗体工作液 50  $\mu$  L, 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 每孔加入 250  $\mu$  L 洗涤液, 30s 后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 5 次, 用吸水纸拍干。加入 HRP 标记的抗 His 抗体工作液 100  $\mu$  L, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 重复洗涤步骤, 加入底物显色液用化学发光检测仪进行测定。

[0121] 用每个检测样本溶液的发光强度平均值 (B) 除以第一个标准品溶液 (0 标准) 的发光强度值 ( $B_0$ ) 的比值, 从标准曲线上读出检测样本溶液中的吸光度值, 再根据标准品溶液的浓度值, 换算出检测样本溶液中腐马素的残留量。

## [0122] 四、试剂盒的效果检测

## [0123] (一) 标准品精密度试验

[0124] 按照实验一中所述方法制备试剂盒, 从 3 个不同批次的试剂盒中各抽取 10 个试剂盒 (即 10 个酶标板) 进行实验, 每个酶标板抽出 20 个微孔, 测定 2  $\mu$  g/L 标准品溶液的发光强度值, 计算变异系数, 结果见表 1。

[0125] 变异系数的计算方法: 变异系数 (CV) = 测定结果的标准差与其平均值的百分比。

[0126] 表 1 标准品精密度试验结果 (CV%)

[0127]

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	NO. 1	5.4	7.6	6.2	5.3	5.9	6.0	7.2	7.3	6.8	7.4
	NO. 2	6.3	6.7	5.4	7.6	8.1	5.5	8.0	6.4	5.8	6.9
	NO. 3	7.9	7.2	5.6	6.1	7.8	6.6	7.4	8.2	6.3	5.7

[0128] 通过上述试验结果可以得出, 每批试剂盒各测定 10 次标准品变异系数在 5.3% -8.2% 之间。

## [0129] (二) 样本准确度和精密度试验

[0130] 向不含腐马素的样品 (玉米和牛奶) 中添加腐马素标准品, 使腐马素在样品中的终浓度分别为 0.2、0.5、1.0  $\mu$  g/kg ( $\mu$  g/L); 将添加后的样品分别按照实验三中所述方法进行前处理, 得到检测样本溶液。

[0131] 从三个不同批次的试剂盒中各抽取 3 个试剂盒进行检测, 检测方法如实验三中所

述,每个实验重复 5 次,分别计算变异系数。结果分别见表 2。

[0132] 回收率的计算方法:RG = 测定值与真实值的比值 × 100% ;

[0133] 变异系数的计算方法:CV = (各平行样本的标准差与各平行样本平均值的比值) × 100% ;

[0134] 批内变异系数的计算方法:批内 CV = 同一次测定中各平行样本的变异系数。

[0135] 批间变异系数的计算方法:批间 CV = 同一样本在不同批次测定结果的变异系数,取其平均值。

[0136] 表 2 准确度和精密度试验结果

[0137]

样品	添加浓度 1 (0.2)			添加浓度 2 (0.5)			添加浓度 3 (1.0)		
	平均 RG	批内 CV	批间 CV	平均 RG	批内 CV	批间 CV	平均 RG	批内 CV	批间 CV
玉米 (µg/kg)	82.1	6.4	11.9	81.6	6.9	8.8	87.4	8.1	9.7
	83.2	6.1		81.3	7.6		91.3	7.4	
	86.7	7.6		88.4	7.8		83.7	6.2	
牛奶 (µg/L)	88.9	6.9	8.4	94.5	8.1	10.9	100.7	7.5	9.6
	87.5	7.4		97.6	6.7		102.6	7.9	
	86.2	8.9		99.7	8.6		91.5	8.3	

[0138] 从表中可看出,玉米样品的添加回收率为 81.3%~91.3%;牛奶样品的添加回收率为 86.2%~102.6%,符合准确度的测定标准。玉米样品的批内变异系数为 6.1%~8.1%,批间变异系数为 8.8%~11.9%;牛奶样品的批内变异系数为 6.7%~8.9%,批间变异系数为 8.4%~10.9%,符合精密度小于或等于 20%的规定。

[0139] (三) 交叉反应率试验:

[0140] 选择与腐马素类似结构的化合物和临床使用的代表兽药,测定交叉反应率。通过各种标准曲线分别得到其 50%抑制浓度。用下式计算试剂盒对其它类似物的交叉反应率。

[0141]

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起50\%抑制的腐马素浓度}}{\text{引起50\%抑制的类似物浓度}} \times 100\%$$

[0142]

引起50%抑制的类似物浓度

[0143] 结果如表 3 所示。

[0144] 表 3 试剂盒的特异性

[0145]

药物名称	交叉反应率 (%)
腐马素 B1	100.0

腐马素 B2	30.0
黄曲毒素	< 1
呕吐毒素	< 1
T <sub>2</sub> 毒素	< 1

[0146] 实验表明,本发明试剂盒对腐马素 B1 的特异性好,即本发明试剂盒可以检测腐马素 B1。

[0147] (四) 试剂盒保存期试验

[0148] 试剂盒保存条件为 2 ~ 8℃,经过 12 个月的测定,试剂盒的最大发光强度值(零标准)、50%抑制浓度、腐马素添加实际测定值均在正常范围之内。考虑到运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在 37℃ 保存的条件下放置 8 天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒的各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入 -20℃ 冰箱冷冻 8 天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在 2 ~ 8℃ 至少可以保存 12 个月以上。

## 序列表

<110> 北京维德维康生物技术有限公司  
 <120> 一种检测腐马素的免疫试剂盒及其专用抗体  
 <160>2

<210>1

<211>246

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>1

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

Ser Pro Ser Thr Ser Ile Leu Trp Arg Arg Arg Met Leu Gln Pro Ile  
 210 215 220  
 Thr Val Thr Ser Asp Gly Ala Asp Asp Ser Ser Arg Leu Asp Gln Val  
 225 230 235 240  
 Thr His Glu Cys Cys Arg  
 245

<210>2

<211>738

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

caggtgcagc tgaaggagtc tgggcctggc ctggtgaact taccatcgtc tctgtcccac	60
ctctgcactg tectgaggct cttctcaage acccctttct ccgagtccat atggatccgg	120
caatttcag gaaacaaact ggagtggatg gcctctcag aacttcaaat aagtgtcgag	180
tcatatgacc accctaatag tegaatctct gtcagtcgag acacatccaa gaaccagtct	240
tctgcaattc tgaattctga ctgtacgaac acagccacat attactctgc aacatctcaa	300
tcaagagcta cgtttggcct atggggccaa ggcaccactc tcaactgtctc ctcaggtggc	360
ggcggtagcg gcggtggcgg ttctggagge ggcggttctg atatgcagat gacacagttt	420
cctgtcccct gctgtatata tggcactggg agggccacca tctcatacgc aggcacagg	480
cctatcgaca tttatataga tactattatg gactggaacc aacagaaacc aggacagcca	540
cccagactcc tcgtgatcta tttcattaga gccctacaga atgtggggtc cccaggttca	600
gtggcagtggt gtctgggaca gacttcacce tcaacatcca tcctgtggag gaggaggatg	660
ctgcaaccta ttactgtcac ctccgacggt gcggatgata gttcgagggt ggaccaagtt	720
actcacgaat gctgtcga	738

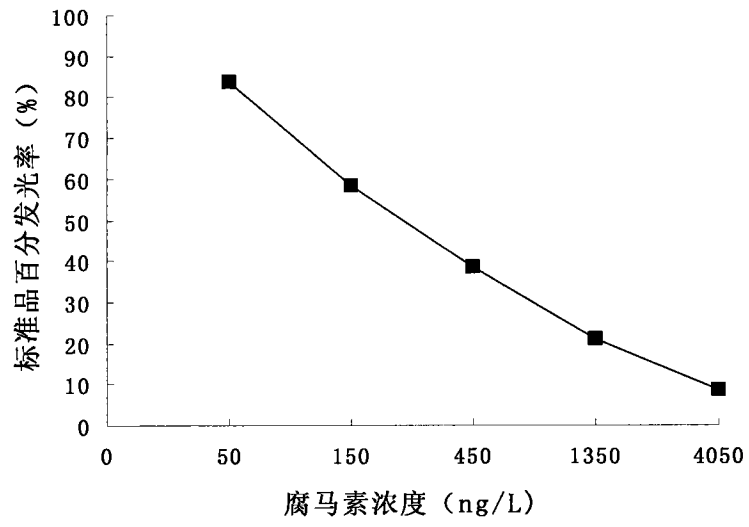


图 1

专利名称(译)	一种检测腐马素的免疫试剂盒及其专用抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN101955542A</a>	公开(公告)日	2011-01-26
申请号	CN201010165204.2	申请日	2010-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 江海洋 吴小平 李杰超 王战辉 徐飞 刘丹 杨光 李娜 杨丽丽 王富伟 王进		
发明人	沈建忠 江海洋 吴小平 李杰超 王战辉 徐飞 刘丹 杨光 李娜 杨丽丽 王富伟 王进		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/577		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101955542B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种检测腐马素的免疫试剂盒及其专用抗体。该单链抗体由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成，所述重链可变区的氨基酸序列如序列1自N端起第1-118位氨基酸残基所示，所述轻链可变区的的氨基酸序列如序列1自N端起第134-246位氨基酸残基所示。本发明抗体的亲和常数为 $1.73 \times 10^9 \text{L/mol}$ 、半数抑制量(IC<sub>50</sub>)0.15ng/mL。本发明为食品中腐马素残留检测方法的建立提供高效价、高特异性的抗体来源。本发明试剂盒的灵敏度高、准确度高、精密度高、对腐马素B1的特异性好，成本低廉。因此，本发明的抗体及试剂盒及检测方法在腐马素B1的检测中将发挥重大作用。

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	NO.1	5.4	7.6	6.2	5.3	5.9	6.0	7.2	7.3	6.8	7.4
	NO.2	6.3	6.7	5.4	7.6	8.1	5.5	8.0	6.4	5.8	6.9
	NO.3	7.9	7.2	5.6	6.1	7.8	6.6	7.4	8.2	6.3	5.7