



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107051397 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201710100437.6

(22)申请日 2017.02.23

(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 涂追 付金衡 许杨

(51)Int.Cl.

B01J 20/24(2006.01)

B01J 20/28(2006.01)

B01D 15/38(2006.01)

B01D 15/20(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表3页

(54)发明名称

特异性识别c-Myc标签纳米抗体的免疫亲和吸附材料

(57)摘要

本发明属于基因工程领域,具体为针对c-Myc标签的单域重链抗体(又称纳米抗体),其具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。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,该高特异性的纳米抗体可作为针对c-Myc的免疫亲和吸附材料,对含有c-Myc标签的重组蛋白进行纯化。

1. 一种c-Myc标签免疫亲和吸附材料,包括载体,搭载在载体上的配基,其特征在于该材料以特异性识别c-Myc标签的单域重链抗体作为配基,所述特异性识别c-Myc标签的单域重链抗体具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的c-Myc标签免疫亲和吸附材料,其特征在于,所述配基为在SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列基础上通过随机或定点突变技术进行改造所获得的能与c-Myc标签特异性结合的抗体。

3. 根据权利要求1所述的c-Myc标签免疫亲和吸附材料,其特征在于,所述载体为磁珠。

4. 根据权利要求1所述的c-Myc标签免疫亲和吸附材料,其特征在于,所述载体为琼脂糖微球。

5. 根据权利要求1所述的c-Myc标签免疫亲和吸附材料,其特征在于,所述载体为硅胶微球或多孔材料。

特异性识别c-Myc标签纳米抗体的免疫亲和吸附材料

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于单域重链抗体(又称纳米抗体技术)的免疫亲和吸附材料,特别是针对c-Myc标签的免疫亲和吸附材料。

技术背景

[0002] c-Myc标签蛋白的发现源于1985年Evan制备获得了一株针对人原癌基因产物Myc蛋白的单克隆抗体9E10,此后研究发现该抗体识别的表位由10个氨基酸残基组成,其序列为Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu,并且这10个氨基酸与其它蛋白融合表达后依然能够保持很强的抗原活性,可以被相应抗体识别,而且不受到蛋白框架的影响。因此,c-Myc标签系统广泛应用于免疫学检测、细胞成像、亲和纯化以及蛋白质工程等 领域。

[0003] 免疫亲和层析、免疫亲和磁珠及免疫共沉淀等技术常用于分离纯化含有c-Myc标签融合蛋白。这类亲和纯化技术基于配基与c-Myc标签特异性结合的原理,一般地,将特异性结合c-Myc标签的配基与载体偶联或吸附,然后用于从溶液中特异性吸附c-Myc标签融合蛋白。

[0004] 市场上针对c-Myc标签融合蛋白纯化用的亲和柱和亲和磁珠,偶联的配基大都是单克隆抗体或多克隆抗体。单克隆抗体的研发和生产过程较为繁琐和复杂,多克隆抗体来源有限。现有的针对c-Myc标签融合蛋白纯化的亲和柱和亲和磁珠价格普遍偏高。而纳米抗体可以在大肠杆菌、酵母等生物中大量表达,有利于降低相关制品的生产成本。

[0005] 蛋白纯化过程中需要用到酸或碱性溶液对目的蛋白进行洗脱。由于单克隆抗体或多克隆抗体由重链和轻链组成,酸碱洗脱会不可避免的导致抗体活性降低,因而不能重复使用。相比之下,单域重链抗体仅由一个结构域组成,具有耐酸碱、耐高温。本发明中提供的亲和吸附材料可重复多次使用。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种针对c-Myc标签的免疫亲和吸附材料及其应用。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 针对c-Myc标签的免疫亲和吸附材料包括载体和配基,所述配基为单域重链抗体,具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。该配基可特异性识别c-Myc标签。

[0009] 所述配基还可以为在前述单域重链抗体基础上通过随机或定点突变技术进行改造所获得的能与c-Myc标签特异性结合的抗体。

[0010] 所述载体为磁珠、琼脂糖凝胶微球、硅胶微球或多孔材料。

[0011] 上述c-Myc标签免疫亲和吸附材料的制备方法,其特征为:

[0012] 所述载体为磁珠时,制备方法为:取1mg羧基磁珠于离心管中,加入600~1000 μ l活化缓冲液(10mM,NaH₂PO₄,pH 6.0),涡旋混合均匀,磁力架回收磁珠,再用活化缓冲液洗涤2遍。分别加入1~5mg碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),涡旋混合后,静置35min。用偶联缓冲液(10mM,Na₂HPO₄,pH 7.4)洗涤磁珠5遍,加入抗c-Myc标签单域重链抗

体,室温反应3~5h,得到共价偶联了抗c-Myc标签单域重链抗体的免疫磁珠;

[0013] 所述载体为琼脂糖凝胶微球时,制备方法为:将CNBr活化的干胶用0.1M HCl洗涤10~20次,每次平衡6~10min。用偶联缓冲液(10mM, Na₂HPO₄, pH 7.2)洗涤5~20次,加入抗c-Myc标签单域重链抗体,室温反应3~10h,得到共价偶联了抗c-Myc标签单域重链抗体的免疫亲和吸附材料;

[0014] 所述载体为硅胶微球时,制备方法为:将硅胶微球用纯水和磷酸缓冲液(PBS, 10mM, pH 6.5)交替洗涤5~15次,用PBS缓冲液悬浮硅胶微球,加入抗c-Myc标签单域重链抗体,混匀,加入终浓度1~10mg/ml的碳二亚胺(EDC),迅速混匀,4℃搅拌反应12~20h,得到共价偶联了抗c-Myc标签单域重链抗体的免疫亲和吸附材料。

[0015] 将上述免疫亲和吸附材料(载体为琼脂糖凝胶微球和硅胶微球)装填至层析柱,即得到c-Myc标签免疫亲和层析柱,方法为:根据层析柱容量,取适量上述免疫亲和吸附材料于层析柱,加入8~10倍柱床体积的PBS(10 mM, pH 7.2)洗涤后,4℃,保存于20%乙醇溶液。

[0016] 本发明还涉及装载有权利要求1所述c-Myc标签免疫亲和吸附材料的亲和层析柱。

[0017] 上述c-Myc标签免疫亲和吸附材料的应用,用所述c-Myc标签免疫亲和吸附材料对样品中含c-Myc标签的蛋白进行纯化。当免疫吸附材料的载体为琼脂糖凝胶微球和硅胶微球时,方法为:首先用PBS(10mM, pH 7.2)洗涤免疫吸附材料,加入样品提取液,然后用纯水淋洗,再用甘氨酸盐酸(pH 2.2)洗脱特异性吸附的含c-Myc标签重组蛋白,收集的洗脱液,纯化后的样品提取液,可用于后续分析检测。当载体为磁珠时,方法为:将免疫磁珠加入纯水中,磁力架回收磁珠,重复清洗3~5次,然后将免疫磁珠加入样品提取液中,混匀,磁力架回收磁珠,纯水清洗3~5次后,用甘氨酸盐酸(pH 2.2)洗脱特异性吸附的c-Myc标签重组蛋白,收集的洗脱液,即为纯化后的样品提取液,可用于后续分析检测。

[0018] 本发明针对c-Myc标签的免疫亲和吸附材料配基为单域重链抗体,具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列,该配基可特异性识别c-Myc标签。该单域重链抗体容易获得,耐热,可以通过生物学方法大量培养生产配基为单域重链抗体,避免了人工抗体等繁琐生产方法,大大降低了生产成本,并且可重复使用,应用前景广阔。

具体实施方式

[0019] 下面通过c-Myc标签免疫亲和吸附材料的制备及应用,对本发明做进一步说明,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。

[0020] 实施例1:

[0021] 抗c-Myc标签单域重链抗体(即针对c-Myc标签的单域重链抗体)免疫文库的构建

[0022] 将c-Myc标签与牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)共价偶联,得到c-Myc人工抗原c-Myc-BSA,取300μg c-Myc-BSA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150μg c-Myc-BSA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。

[0023] RNA的提取参照TAKARA公司RNAiso试剂说明书进行。以RNA为模板, oligo dT为引

物,参照TAKARA公司反转录酶说明书合成cDNA第一链。

[0024] 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AlpVh-LD和CH2-R扩增cDNA,反应条件为,98℃,10s,55℃,20s,72℃,1min,20个循环,98℃,10s,68℃,1min,72℃延伸10min。

[0025] 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AlpVh-SfiI和AlpVHHR1-NotI,AlpVh-SfiI和AlpVHHR2-NotI,进行扩增,反应条件为,98℃,10s,50℃,20s,72℃,40s,5个循环,98℃,10s,68℃,40s,30个循环,72℃延伸10min。经DNA片段回收试剂盒回收、定量,于-20℃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℃,过夜连接。

[0026] 表1文库构建及鉴定所用的引物

引物名称	序列
AlpVh-LD	5' - CTTGGTGGTCCTGGCTGC- 3'
AlpVh-SfiI	5' - <u>tcgcgcccccagccggccatggcc</u> CAGKTGCAGCTCGTGGAGTCNGGNGG- 3'
AlpVHHR1-NotI	5' - cgagtgcggcgcGGGGTCTTCGCTGTGGTCCG- 3'
AlpVHHR2-NotI	5' - cgagtgcggcgcTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG- 3'
CH ₂ -R	5' - GGTACGTCTGTTGAACCTGTCC- 3'
M13-R	5' - AGCGGATAACAATTCACACAGGA- 3'
pHEN-R	5' - GCCCCATTCAGATCCTCTTC- 3'

[0027] 注:下划线表示限制性内切酶识别序列

[0028] 连接产物经乙醇沉淀后,溶于10μL无菌水,分十次进行电穿孔转化大肠杆菌TG1。取10μL电击、培养后的菌液倍比稀释,涂布氨苄青霉素2×YT培养板,计算库容。其余部分全部涂布于24cm×24cm氨苄青霉素2×YT培养板,37℃,倒置培养13~16h。用10mL,2×YT培养基将培养板上的菌苔刮洗后,加入终浓度20~30%甘油,分装,-80℃保存备用。

[0029] 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),37℃,200r/min培养至OD₆₀₀达0.5,按感染复数20:1加入辅助噬菌体,37℃,200r/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,37℃,200r/min过夜培养后,8000rpm离心取上清,加入5×PEG/NaCl溶液,冰上放置1.5h或4℃过夜,8000rpm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c-Myc标签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。

[0030] 实施例2:

[0031] 抗c-Myc标签单域重链抗体的淘选与鉴定

[0032] 采用固相亲和淘选的方法从实施例1所得抗c-Myc标签单域重链抗体免疫文库中淘选针对c-Myc标签的单域重链抗体。向每个酶标孔中加入120μL用PBS稀释的Myc-GST融合蛋白(Myc标签与谷胱甘肽融合蛋白),4℃,包被过夜,每轮淘选的包被浓度分别为100,75,50μg/mL;吸出包被液,PBS洗板5次,每孔加入300μL 3%BSA-PBS,37℃,封闭2h;PBS洗板5次,加入100μL噬菌体抗体文库(约含1×10¹¹CFU),37℃,孵育2.0h;吸出未结合的噬菌体,用PBST(含0.5%Tween-20)洗板3~5次(逐轮增加5次),再用PBS洗板15~25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35μL Tris-HCl(1mol/L,pH 8.0)中和洗脱物,取10μL用于滴度测定,其余125μL洗脱物扩增后用于下一轮淘

选。

[0034] 经四轮淘选后,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phage-ELISA测定噬菌体颗粒的结合活性和特异性,实验设定对照,具体加样步骤见表2。

[0035] 表2间接phage-ELISA加样表

	实验组	对照 a	对照 b
	c-Myc 标签融合蛋白	不含 c-Myc 标签的蛋白 (同实验组蛋白)	BSA
[0036]	封闭	1×Blocking buffer (3%脱脂牛奶 W/V)	
	结合	噬菌体	
	二抗	HRP/anti-M13	

[0037] 将ELISA阳性克隆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c-Myc标签的单域重链抗体。

[0038] DNA序列 (SEQ ID NO.:2):

[0039] CAGTTGCAGCTCGTGGAGTCAGGGGGAGGCTTGGTGCAGTCTGGGGGGTCTCTAA
TACTCTCCTGCTCAGCCTCTGGATTCAATATATCACGATATTCCGTAGGGTGGTTCCGCG
AGACCTCAGGAGAAAAGCGTGAGGGAATCTCATGTATGGACGAGAATGGCGACATTAC
CGCCTTCTCAGACGCCATACAGGGCCGATTCACCATCTCTCGAGCCAATGATAAGAATA
TGATATACTTACACATGGACGCCCTGAACCCTTCGGACACGGCCAATTATCGGTGTGTC
GCCAGTTGGGACTGTTTCAGCACAGGGTTTTATCACACACAAGACCCTCACCGGCATCT
GGGGTCCGGGGACCCAGGTCACCGTGTACGA

[0040] 编码具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列:

[0041] QLQLVESGGGLVQSGGSLILSCSASGFNISRYSVGFRETSGEKREGISCMDENGDITA
FSDAIQGRFTISRANKNMIYHLMDALNPSDTANYRCVASWDCSAQGFITHKTLTGIWGP GTQVTVSA。

[0042] 实施例3:

[0043] 抗c-Myc标签单域重链抗体的规模制备

[0044] 编码抗c-Myc标签单域重链抗体的DNA片段的获取:1.采用限制性内切酶SfiI/NotI,双酶切噬菌粒pHEN-anti-c-Myc单域重链抗体基因,琼脂糖凝胶电泳回收抗c-Myc标签单域重链抗体基因;2.直接将抗c-Myc标签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。

[0045] 将得到的抗c-Myc标签单域重链抗体基因片段克隆至表达载体 pET25-flag (已将载体本身所带c-Myc标签替换为Flag标签: DYKDDDDK),经PCR和酶切鉴定,构建完成抗c-Myc标签单域重链抗体的大肠杆菌表达质粒。

[0046] 将表达质粒转化至大肠杆菌rosetta,挑取单菌落进行诱导表达。将单菌落接入5mL LB-A (Luria-Bertani broth with 100µg/mL ampicillin)液体培养基中,37°C、220r/min振荡培养12h;以1%培养基体积的接种量将其转接到50mL LB-A液体培养基中,37°C、

220r/min 振荡培养至OD₆₀₀达到0.5 (约需3~3.5h),加入终浓度0.1mM的IPTG, 30℃、200r/min诱导培养。

[0047] 诱导培养物8000r/min离心,在细胞沉淀中加入25mL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15mL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5s,共250个循环,在4℃下对细胞破碎物 8000r/min离心15min,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20%的甘油,混匀,保存于-20℃冰柜待用。

[0048] 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(单域重链抗体)表达量,为大量制备抗c-Myc标签单域重链抗体提供了途径。

[0049] 抗c-Myc标签单域重链抗体的融合表达:

[0050] 将本发明抗c-Myc标签单域重链抗体基因克隆至融合表达载体pAP(含 有碱性磷酸酶基因),经PCR和酶切鉴定,构建完成抗c-Myc标签单域重 链抗体的碱性磷酸酶融合表达质粒。

[0051] 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。该酶常作为信号元件用于ELISA、免疫印迹、组织 化学等检测方法。融合表达质粒将抗c-Myc标签单域重链抗体融合于碱性 磷酸酶的N端,参考应用实例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-anti-c-Myc标签单域重链抗体。

[0052] 抗c-Myc标签的纳米抗体的耐热实验

[0053] 通过ELISA实验对纳米抗体热稳定性进行测定,实验方法如下:

[0054] 取浓度为5μg/mL Myc-GST蛋白,以每孔100μL加入96孔酶标板 中,4℃包被过夜;0.05%PBST洗板3次;3%的脱脂牛奶37℃封闭1 h;加入稀释后的c-Myc纳米抗体,每孔100 μL,37℃,孵育1h;加入1:2000工作浓度HRP标记的抗His标签二抗,每孔加入100μL,37℃,孵育1h;加入TMB显色液,每孔加入100μL;在多组不同在温度下孵 育30min;反应结束后,加入2M硫酸终止反应,每孔加入50μL,混匀 终止反应后测定450nm吸光值。

[0055] 结果显示即使温度高达70℃、80℃、90℃,蛋白活性依然具有生物活 性,OD₄₅₀值分别为1.5、1.3、1.0,具有较好的耐热性。

[0056]

[0057] 实施例4:

[0058] c-Myc标签免疫亲和磁珠的小量制备

[0059] 采用纳米磁珠作为载体,偶联抗c-Myc标签单域重链抗体后,得到 c-Myc标签免疫磁珠,具体制备方法如下:

[0060] 取1mg羧基修饰的磁珠于离心管中,加入500μl活化缓冲液(10mM, NaH₂PO₄, pH 6.0),涡旋混合均匀,磁力架回收磁珠,再用活化缓冲液洗 涤3遍。分别加入2mg碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 涡旋混合后,静置25min。用偶联缓冲液(10mM,Na₂HPO₄, pH 7.4)洗 涤磁珠3遍,加入溶于偶联缓冲液的抗c-Myc标签单域重链抗体1mg,室 温反应3.5h,用偶联缓冲液洗涤磁珠5次,加入500μl含1%(w/v) 牛血清白蛋白(BSA)或1%(w/v) 卵清蛋白(OVA)的偶联缓冲液封闭 未反应的活性基团,室温反应35min。用偶联缓冲液洗涤磁珠5次,PBS 溶液(10mM,pH 7.2,0.02%w/v,Na₃N)重悬后保存于4℃。

[0061] 实施例5:

[0062] c-Myc标签免疫亲和吸附材料及亲和柱的制备

[0063] 采用琼脂糖微球作为载体,偶联抗c-Myc标签单域重链抗体,具体制备方法如下:

[0064] 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(10mM, Na₂HPO₄, pH 7.2)洗涤10次,加入抗c-Myc标签单域重链抗体(2mg/每克琼脂糖微球),室温反应3.5h,使抗c-Myc标签单域重链抗体与CNBr活化的琼脂糖凝胶微球共价偶联。用偶联缓冲液(10mM, Na₂HPO₄, pH 7.2)洗涤3次后,加入封闭液室温反应2.5h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, pH 7.2)和醋酸缓冲液(0.1M, pH 4.5)交替洗涤3次,得到共价偶联了抗c-Myc标签单域重链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1 ml的层析柱,8~10倍柱床体积的PBS(10mM, pH 7.2)洗涤后,加入20%乙醇溶液,4℃保存。

[0065] 实施例6:

[0066] c-Myc标签免疫亲和吸附材料及亲和柱的制备

[0067] 采用硅胶微球作为载体,偶联抗c-Myc标签单域重链抗体,具体制备方法如下:

[0068] 取2g硅胶微球用纯水和磷酸缓冲液(PBS, 10mM, pH 6.5)交替洗涤6~10次,用10ml PBS缓冲液悬浮硅胶微球,加入5mg抗c-Myc标签单域重链抗体,混匀,加入终浓度5mg/ml的碳二亚胺(EDC),迅速混匀,4℃搅拌反应12~20h,得到共价偶联了抗c-Myc标签单域重链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,5~10倍柱床体积的PBS(10mM, pH 6.5)洗涤后,加入含0.02% (w/v) Na₃N的PBS(10mM, pH 6.5),4℃保存。

[0069] 实施例7:

[0070] c-Myc标签亲和层析柱的吸附量、重复使用测定

[0071] 用6倍柱床体积PBS(10mM, pH 7.2)清洗柱子,加入蛋白样品溶液,流出液重新过柱。然后用3倍柱床体积纯水淋洗,再用甘氨酸盐酸(pH 2.2)洗脱特异性吸附的含c-Myc标签重组蛋白,收集的洗脱液,即为纯化后的蛋白溶液。实验结果表明,装填有1mL实施例5、6、7制备的亲和柱/磁珠可以特异性吸附目的蛋白。重复使用10次之后,回收率仍然大于80%。可以通过生物学方法大量培养生产配基为单域重链抗体,避免了人工抗体等繁琐生产方法,大大降低了生产成本,并且可重复使用,应用前景广阔。

SEQUENCE LISTING

<110> 南昌大学

<120> 特异性识别c-Myc标签纳米抗体的免疫亲和吸附材料

<130> 2017

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ile Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asn Ile Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Ser Val Gly Trp Phe Arg Glu Thr Ser Gly Glu Lys Arg Glu Gly Ile
 35 40 45
 Ser Cys Met Asp Glu Asn Gly Asp Ile Thr Ala Phe Ser Asp Ala Ile
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asn Asp Lys Asn Met Ile Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Met Asp Ala Leu Asn Pro Ser Asp Thr Ala Asn Tyr Arg Cys
 85 90 95
 Val Ala Ser Trp Asp Cys Ser Ala Gln Gly Phe Ile Thr His Lys Thr
 100 105 110
 Leu Thr Gly Ile Trp Gly Pro Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ala
 115 120 125

<210> 2

<211> 381

<212> DNA

<213> Lama pacos

<400> 2

cagttgcagc tcgtggagtc agggggaggc ttggtgcagt ctggggggtc tctaatactc 60
 tcctgctcag cctctggatt caatatatca cgatatccg tagggtggtt ccgcgagacc 120
 tcaggagaaa agcgtgaggg aatctcatgt atggacgaga atggcgacat taccgccttc 180
 tcagacgcca tacagggccg attcaccate tctcgagcca atgataagaa tatgatatac 240
 ttacacatgg acgccctgaa cccttcggac acggccaatt atcgggtgtgt cgccagttgg 300
 gactgttcag cacagggttt tatcacacac aagaccctca ccggcatctg gggtccgggg 360

accaggtca ccgtgtcagc a	381
<210> 3	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 3	
cttgggtggtc ctggctgc 18	
<210> 4	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<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	
tcgcggccca gccggccatg gccagktgc agctcgtgga gtcngngg 49	
<210> 5	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 5	
cgagtgcggc cgcgggtct tcgctgtggt gcg 33	
<210> 6	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 6	
cgagtgcggc cgcttgtggt tttggtgtct tggg 34	
<210> 7	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 7	
ggtacgtgct gttgaactgt tcc 23	

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

agcggataac aatttcacac agga 24

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

gccccattca gatcctette 20

专利名称(译)	特异性识别c-Myc标签纳米抗体的免疫亲和吸附材料		
公开(公告)号	CN107051397A	公开(公告)日	2017-08-18
申请号	CN201710100437.6	申请日	2017-02-23
[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 涂追 付金衡 许杨		
发明人	李燕萍 涂追 付金衡 许杨		
IPC分类号	B01J20/24 B01J20/28 B01D15/38 B01D15/20 G01N33/53		
CPC分类号	B01J20/24 B01D15/206 B01D15/3804 B01J20/103 B01J20/28009 B01J20/28019 G01N33/53		
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c-Myc标签的单域重链抗体(又称纳米抗体)，其具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。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，该高特异性的纳米抗体可作为针对c-Myc的免疫亲和吸附材料，对含有c-Myc标签的重组蛋白进行纯化。

引物名称	序列
AlpVh-LD	5' - CTTGGTGGTCCCTGCCTGC - 3'
AlpVh-SfiI	5' - <u>tcgggcccagccggccatggcc</u> CAGTGCAGCTCGTGGAGTCNGGNGG- 3'
AlpVHHR1-NotI	5' - <u>cgagtgggcccgc</u> GGGCTCTTCGCTGTGTGGC- 3'
AlpVHHR2-NotI	5' - <u>cgagtgggcccgc</u> TTGTGGTTTTGCTGTCTTGGG- 3'
CH ₂ -R	5' - GGTACGTGCTGTTCAACTGTTC- 3'
M13-R	5' - AGCGGATAACAATTCACACAGGA- 3'
pHEN-R	5' - GCCCCATTGAGATCCTCTTC- 3'