



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101857866 B

(45) 授权公告日 2013.04.24

(21) 申请号 201010156172.X

(22) 申请日 2010.04.23

(73) 专利权人 江苏省农业科学院  
地址 210014 江苏省南京市玄武区钟灵街  
50号

(72) 发明人 刘媛 刘贤金 梁颖 张存政  
王耘 温爽

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 孙忠浩

(51) Int. Cl.

C12N 15/13(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C07K 16/14(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101196520 A, 2007.12.17, 全文.

孙蔚榕等. 微囊藻毒素时间分辨荧光免疫分析方法. 《卫生研究》. 2007, 第36卷(第2期), 摘要部分.

王刚等. 噬菌体抗体库几种筛选方法的比较. 《第四军医大学学报》. 2001, 第22卷(第16期), 1482-1483页.

Norihiro et al. Corrigendum to "Dissociation-independent selection of high-affinity anti-hapten phage antibodies using cleavable biotin-conjugated haptens. 《analytical Biochemistry》. 2006, 第357卷摘要部分.

Jacqui McElhiney et al. Rapid Isolation of a single-Chain Antibody against the Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR by Phage Display and Its Use in the Immunoaffinity Concentration by Phage Display and its use in the Immunoaffinity Concentration of Microcystins from water. 《Applied and environmental Microbiology》. 2002, 第68卷(第11期), 5288-5290页.

审查员 王超

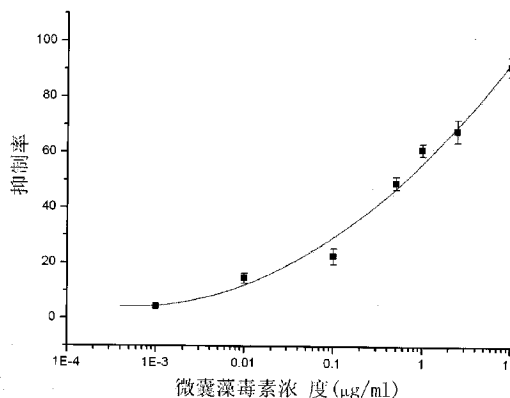
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

微囊藻毒素 LR 的单链抗体的筛选方法及其鉴定

(57) 摘要

本发明涉及一种微囊藻毒素 LR 的单链抗体的筛选方法及其鉴定。是将生物素化的微囊藻毒素 LR 利用亲和素标记磁珠和负筛选方法, 在人源合成抗体库中进行两轮亲和筛选; 再对第二轮产出的噬菌体克隆提取总质粒 DNA, 经过 Sfi I 酶切后胶回收得到单链抗体基因, 与同样酶切后的可溶性表达的载体 pAK100CL 进行连接, 连接后的载体电转化入大肠杆菌 XL1-Blue 中, 获得可溶性表达的单链抗体; 用竞争型时间分辨荧光免疫分析法, 对可溶性表达的单链抗体进行鉴定。其优点是: 本发明具有筛选快速简便, 并能更好的将微囊藻毒素 LR 立体结构暴露于孵育体系中; 同时对筛选结果的鉴定, 具有检测信号高、抗基质干扰能力强的优点。



1. 一种微囊藻毒素 LR 的单链抗体的筛选方法,是将半抗原利用亲和素标记磁珠和负筛选方法,在人源合成抗体库中进行两轮亲和筛选,获得能够展示型表达微囊藻毒素 LR 特异性单链抗体的 M13 丝状噬菌体克隆;再将第二轮筛选获得的噬菌体克隆的单链抗体基因与可溶性表达载体连接,转入大肠杆菌进行表达,获得可溶性表达的单链抗体,其特征在于:所述的半抗原为生物素化的微囊藻毒素 LR;所述的可溶性表达载体为 pAK100CL;所述的转入大肠杆菌进行表达是指:对第二轮产出的噬菌体克隆提取总质粒 DNA,经过 Sfi I 酶切后胶回收得到单链抗体基因,再与同样酶切后的可溶性表达的载体 pAK100CL 进行连接,连接后的载体电转化入大肠杆菌 XL1-BIue 中;

所述的用亲和素标记磁珠和负筛选方法,在人源合成抗体库中进行两轮亲和筛选是指:

在第一轮筛选中,将 1nmol 的生物素加入亲和素标记磁珠结合后,再加入人源合成抗体库预孵育,去除抗体库中针对生物素、亲和素和磁珠部分的非特异性噬菌体,实现负筛选;再将负筛选后的抗体库与结合有生物素化微囊藻毒素 LR 的亲和素标记磁珠进行孵育,在磁性支架上快速分离得到带有微囊藻毒素 LR 特异性噬菌体的磁珠,用胰蛋白酶将磁珠上的噬菌体洗脱下来;

在第二轮筛选中,将第一轮筛选获得的噬菌体,先重复第一轮筛选相同的方法实现负筛选后,加入 5pmol 的生物素化的微囊藻毒素 LR 孵育后,再加入亲和素标记磁珠继续孵育,然后在磁性支架上快速分离磁珠,弃去上清,用胰蛋白酶将磁珠上的噬菌体洗脱下来;

用胰蛋白酶将磁珠上的噬菌体洗脱下来是指:用含 0.5% Tween20 的 TBST 洗涤磁珠 2 次,加入 50  $\mu$ l 60  $\mu$ g/ml 的胰蛋白酶,振荡器低速振荡 30min,将噬菌体从磁珠上洗脱下来,再加入 50  $\mu$ l 100  $\mu$ g/ml 的胰蛋白酶抑制剂终止反应。

2. 一种针对权利要求 1 所述方法中两轮筛选后洗脱噬菌体和可溶性表达单链抗体的鉴定,其特征在于:用亲和素包被酶标板固定微囊藻毒素 LR 和以 Eu 标记的抗 M13 单抗作为二抗,建立非竞争型时间分辨免疫荧光分析法,对每轮筛选后产出噬菌体的整体亲和力进行鉴定;用羊抗鼠 IgG 包被的酶标板和 Eu 标记的游离微囊藻毒素 LR 建立竞争型时间分辨免疫荧光分析法,对可溶性表达的单链抗体进行鉴定,测定微囊藻毒素 LR 单链抗体的抑制中浓度  $I_{50}$ 、最低检测限  $I_{10}$  以及检测线性范围  $I_{20}$ - $I_{80}$ 。

## 微囊藻毒素 LR 的单链抗体的筛选方法及其鉴定

### 技术领域：

[0001] 本发明涉及一种微囊藻毒素 LR 的单链抗体的筛选方法及其鉴定。

### 背景技术：

[0002] 微囊藻毒素是富营养化的淡水水体中常见的藻类毒素，它是一类具有蛋白磷酸酶抑制和强烈致肝癌作用的环状七肽。目前已经报道的微囊藻毒素已有 60 多种，其中微囊藻毒素 LR 是已知毒性最强，急性危害最大的一种淡水蓝藻毒素。1998 年世界卫生组织 (WHO) 在饮用水标准指导中，增加了对微囊藻毒素 LR 的指导为 1ppb，我国现行的生活饮用水水质规范，也包含了微囊藻毒素 LR 的检测项目。

[0003] 目前利用噬菌体展示技术，筛选制备微囊藻毒素 LR 的单链抗体或多肽配体的研究，已有少量报道。McElhiney 等 [Jacqui McElhiney, Mathew Drever, Linda A. Lawton, and Andy J. Porter. Rapid Isolation of a single-chain antibody against the cyanobacterial toxin microcystin-LR by phage display and its use in the immunoaffinity concentration of microcystins from water [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 5288-5295.] 和 Strachen 等 [G. Strachan, J. McElhiney, M. R. Drever, F. McIntosh, L. A. Lawton, A. J. R. Porter. Rapid selection of anti-hapten antibodies isolated from synthetic and semi-synthetic antibody phage display libraries expressed in Escherichia coli [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 210, 257-261] 分别报道了在 Griffin 库与 Tomlison 库中，用微囊藻毒素 LR 与载体蛋白 BSA 和 KLH 的连接物包被免疫管用于筛选过程，和采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 进行鉴定，最终获得微囊藻毒素 LR 的单链抗体的研究。Zhao 等 [S. W. Zhao, P. P. Shen, Y. Zhou, Y. Wei, X. B. Xin, Z. C. Hua. Selecting peptide ligands of microcystin-LR from phage displayed random libraries [J]. Environment International, 2005, 31, 535-541] 则利用了双抗夹心原理，用商品化的微囊藻毒素 LR 单抗包被酶标板，用于筛选噬菌体抗体，以及用微囊藻毒素 LR 直接固定于 Nunc 公司的共价交联酶标板后用于筛选，分别获得了 2 种微囊藻毒素 LR 的多肽配体。

[0004] 关于微囊藻毒素 LR 常见的检测方法有液相色谱法，免疫分析法，磷酸酶抑制法，细胞毒性法和生物分析法等。其中，免疫分析法作为常用的微囊藻毒素的筛选检测方法，其关键检测试剂抗体的类型包括传统的多克隆抗体、单克隆抗体和新型的单链抗体等。现有的微囊藻毒素 LR 的单链抗体的筛选鉴定的研究中，普遍存在筛选方法单一，鉴定检测信号偏低，受培养液基质干扰较大的问题。

[0005] 目前以生物素化的微囊藻毒素 LR 作为筛选半抗原，将亲和素标记磁珠应用于筛选微囊藻毒素 LR 单链抗体的研究，以及在上述筛选的过程中利用非竞争型时间分辨免疫荧光分析法或竞争型时间分辨荧光免疫分析法予以鉴定，国内外均没有文献报道。

### 发明内容：

[0006] 本发明的目的在于：针对目前微囊藻毒素 LR 单链抗体的筛选方法单一且效率不高，鉴定方法检测信号偏低，受培养液基质干扰较大的难题，提供了一种微囊藻毒素 LR 的单链抗体的筛选鉴定方法，该单链抗体亦有潜力在水体及生物样本中微囊藻毒素检测及净化富集中得到应用。

[0007] 本发明的目的是这样实现的：一种微囊藻毒素 LR 的单链抗体的筛选方法，是将半抗原利用亲和素标记磁珠和负筛选方法，在人源合成抗体库中进行两轮亲和筛选；获得能够展示型表达微囊藻毒素 LR 特异性单链抗体的 M13 丝状噬菌体克隆；再将第二轮筛选获得的噬菌体克隆的单链抗体基因与可溶性表达载体连接，其特征在于：所述的半抗原为生物素化的微囊藻毒素 LR；所述的可溶性表达载体为 pAK100CL；所述的转入大肠杆菌进行表达是指：对第二轮产出的噬菌体克隆提取总质粒 DNA，经过 Sfi I 酶切后胶回收得到单链抗体基因，与同样酶切后的可溶性表达的载体 pAK100CL 进行连接，连接后的载体电转化入大肠杆菌 XL1-BIue 中。

[0008] 在本发明中：所述的用亲和素标记磁珠和负筛选方法，在人源合成抗体库中进行两轮亲和筛选是指：

[0009] 在第一轮筛选中，将 1nmol 的生物素加入亲和素标记磁珠结合后，再加入人源合成抗体库预孵育，去除抗体库中针对生物素、亲和素和磁珠部分的非特异性噬菌体，实现负筛选；再将负筛选后的抗体库与结合有生物素化微囊藻毒素 LR 的亲和素标记磁珠进行孵育，在磁性支架上快速分离得到带有微囊藻毒素 LR 特异性噬菌体的磁珠，用胰蛋白酶将磁珠上的噬菌体洗脱下来；

[0010] 在第二轮筛选中，将第一轮筛选获得的噬菌体，先重复第一轮筛选相同的方法实现负筛选后，加入 5pmol 的生物素化的微囊藻毒素 LR 孵育后，再加入亲和素标记磁珠继续孵育，然后在磁性支架上快速分离磁珠，弃去上清，用胰蛋白酶将磁珠上的噬菌体洗脱下来。

[0011] 在本发明中：用胰蛋白酶将磁珠上的噬菌体洗脱下来是指：用胰蛋白酶将磁珠上的噬菌体洗脱下来是指：用含 0.5% Tween20 的 TBST 洗涤磁珠 2 次，加入 50  $\mu$ l 60  $\mu$ g/ml 的胰蛋白酶，振荡器低速振荡 30min，将噬菌体从磁珠上洗脱下来，再加入 50  $\mu$ l 100  $\mu$ g/ml 的胰蛋白酶抑制剂终止反应。

[0012] 一种上述方法中的鉴定，其特征在于：用非竞争型时间分辨免疫荧光分析法，对每轮筛选后产出噬菌体的整体亲和力进行鉴定；用竞争型时间分辨荧光免疫分析法，对可溶性表达的单链抗体进行鉴定，测定微囊藻毒素 LR 单链抗体的抑制中浓度 ( $I_{50}$ )、最低检测限 ( $I_{10}$ ) 以及检测线性范围 ( $I_{20}$ - $I_{80}$ )。

[0013] 本发明的优点在于：本发明涉及的微囊藻毒素 LR 的单链抗体的筛选方法，筛选周期短，无需单、多克隆抗体的复杂的免疫和杂交瘤细胞筛选过程。与现有少量的微囊藻毒素单链抗体制备报道相比，采用亲和素磁珠法代替传统的免疫管法和包被酶标板法进行筛选，具有分离快速简便，且能更好的将半抗原立体结构暴露与孵育体系中的优点。筛选过程和单链抗体的鉴定采用时间分辨荧光免疫分析法，该方法与传统的酶联免疫吸附法 (ELISA) 相比，具有检测信号高，抗基质干扰能力强的优点，有利于单链抗体的筛选和鉴定。

## 附图说明

[0014] 图 1 是利用非竞争型时间分辨免疫分析方法,对原始抗体库与两轮筛选后的噬菌体储备液的噬菌体免疫分析结果。

[0015] 图 2 是利用竞争型时间分辨免疫分析方法,测定可溶性表达的单链抗体对微囊藻毒素 LR 的标准抑制曲线。

### 具体实施方式

[0016] 下面结合附图对本发明作进一步的描述。

[0017] 实施例 1. 微囊藻毒素 LR 单链抗体的第一轮筛选

[0018] 本发明在两轮亲和筛选过程中,所用的人源合成抗体库含有的噬菌体的单链抗体基因是被插入在噬菌体的 PIX 蛋白基因编码序列中,单链抗体表达时与 PIX 蛋白一起融合表达在噬菌体衣壳蛋白上,为展示型,被用于抗体库的亲和筛选。

[0019] (1) 洗涤磁珠:吸取 100  $\mu$  I 免疫磁珠 (Invitrogen 公司提供,下同) 和 900  $\mu$  I TBST(含 1% Tween20 的 TBS 缓冲液),加入 1.5ml 离心管中充分混匀,将离心管放置在磁性支架上静置 1-2 分钟,直到混合液变的澄清且磁珠全部吸附在靠近磁性支架的离心管内壁上,用移液器将上清液体移去。再加入 1ml 含 TBST,同样步骤再次洗涤磁珠一次。最后将磁珠重悬于 1ml 含有 1% BSA 的 TBST 缓冲液中备用。

[0020] (2) 包被磁珠:取 500  $\mu$  I 上一步洗涤后的磁珠加入 1nmol 的生物素 (Sigma 公司提供),剩下 500  $\mu$  I 的磁珠则加入 1nmol 的生物素标记的微囊藻毒素 LR(芬兰 Turku 大学生物系提供),室温下在旋转混合器上孵育 1h。磁性支架上收集磁珠,移去上清液,用 1ml TBST 洗涤磁珠,重复洗涤 3 次,去除未结合在磁珠上的生物素或生物素标记的微囊藻毒素 LR。将 2 种洗涤后的包被磁珠分别重悬于 50  $\mu$  I 含有 1% BSA 的 TBST 缓冲液中。

[0021] (3) 负筛选:取 10  $\mu$  I 生物素包被的亲合素标记磁珠加入 1ml 含有  $5 \times 10^{12}$  个噬菌体的人源合成抗体库(由芬兰 Turku 大学生物系提供,下同)的 TBS 缓冲液,室温下在旋转混合器上孵育 1h,吸附掉抗体库中针对亲和素 (Sigma 公司提供)、生物素和磁珠的非特异性噬菌体,实现负筛选。在磁性支架上收集磁珠,将上清液加入新的离心管中,再加入 10  $\mu$  I 生物素化微囊藻毒素 LR 包被的亲合素标记磁珠,在旋转混合器上室温孵育 1h。磁性支架分离磁珠,用含 0.5% Tween20 的 TBS 缓冲液洗涤磁珠 2 次,再加入 50  $\mu$  I 60  $\mu$  g/ml 的胰蛋白酶 (Sigma 公司提供,下同),振荡器低速振荡 30min,将噬菌体从磁珠上洗脱下来。加入 50  $\mu$  I 100  $\mu$  g/ml 的胰蛋白酶抑制剂 (Sigma 公司提供,下同) 终止反应。第一轮筛选洗脱下来的噬菌体用于感染大肠杆菌 XL1-Blue (Stratagene 公司提供),并利用辅助噬菌体 VCSM13 (Stratagene 公司提供) 辅助增殖后,制备噬菌体储备液用于第二轮筛选。大肠杆菌感染试验测定储备液效价及第一轮筛选的投入产出比。

[0022] 实施例 2. 微囊藻毒素 LR 单链抗体的第二轮筛选

[0023] 将第一轮筛选后制备的噬菌体储备液用于第二轮筛选,此轮筛选投入的噬菌体量为  $2 \times 10^{11}$  个噬菌体(同实施例 1)。先是采用与第一轮筛选相同的方法完成磁珠洗涤,包被磁珠和负筛选的步骤,然后将负筛选后的第一轮噬菌体储备液分别与加入 5pmol 的生物素化的微囊藻毒素 LR,室温旋转孵育 10min 后,再加入 50  $\mu$  I 洗涤后的亲和素标记磁珠,继续室温旋转孵育 5min。磁性支架分离磁珠,用含 0.5% Tween20 的 TBST 洗涤磁珠 2 次,每管加入 50  $\mu$  I 60  $\mu$  g/ml 的胰蛋白酶,振荡器低速振荡 30min,将噬菌体从磁珠上洗脱下来。

再加入 50  $\mu$ l 100  $\mu$ g/ml 的胰蛋白酶抑制剂终止反应。对洗脱下来的噬菌体,与第一轮筛选同样方法制备噬菌体储备液,并计算噬菌体储备液效价及第二轮筛选的投入产出比。

[0024] 如表 1 所示,第一轮和第二轮筛选噬菌体的投入产出比分别为  $5.93 \times 10^7$  和  $2.37 \times 10^6$ ,结果表明两轮筛选均对表达微囊藻毒素的单链抗体的噬菌体起到富集作用,而第一轮投入产出比高于第二轮,是由于初始抗体库具有最大的多样性,经过第一轮亲和筛选大量的微囊藻毒素非特异性噬菌体被洗脱掉,因此投入产出比较高。虽然第二轮亲和筛选的条件较为苛刻,但是筛选时所用的第一轮产出噬菌体已经对微囊藻毒素具有一定亲和作用,多样性大大降低,被洗去的非特异性噬菌体减少,因此经过第二轮亲和筛选产出的噬菌体较多,而投入产出比相对降低。

[0025] 表 1 两轮筛选的投入产出比

[0026]

	第一轮筛选		第二轮筛选	
	投入	产出	投入	产出
噬菌体数量	$5 \times 10^{12}$	$8.43 \times 10^4$	$2 \times 10^{11}$	$8.43 \times 10^4$
投入产出比	$5.93 \times 10^7$		$2.37 \times 10^6$	

[0027] 实施例 3. 非竞争型时间分辨荧光免疫分析法,对初始抗体库及两轮筛选后噬菌体储备液进行噬菌体免疫分析。

[0028] 非竞争型时间分辨荧光免疫分析法具体步骤如下:

[0029] (1) 将亲和素包被的酶标板用洗涤缓冲液洗涤 1 次。

[0030] (2) 将生物素化微囊藻毒素 100  $\mu$ l 每孔,加入酶标板。室温下,700rpm 振荡器上孵育 0.5h。洗涤缓冲液洗板 4 次。

[0031] (3) 对原始抗体库和 2 轮筛选后的噬菌体储备液进行稀释,稀释后的噬菌体效价为  $10^{10}$  tfu/100  $\mu$ l。100  $\mu$ l/孔加入酶标板,每个样品设 3 个重复,留有 3 个不加噬菌体样品的孔作为空白对照孔。室温下,700rpm 振荡器上孵育 1h。洗涤缓冲液洗板 4 次。

[0032] (4) 100  $\mu$ l/孔加入 Eu 标记的抗 VCSM13 单抗,含量为 1.5pg/孔,室温下,700rpm 振荡器上孵育 1h。洗涤缓冲液洗板 4 次。

[0033] (5) 100  $\mu$ l/孔加入荧光增强液,室温下,700rpm 振荡器上孵育 15min,在多标记微孔板分析仪上进行读数。

[0034] 在图 1 中,以筛选轮数为横坐标,初始抗体库为 0 轮,纵坐标为样品荧光强度与空白孔的背景荧光的比值 (S/B)。由于试验用亲和素包被酶标板上连接有生物素化的微囊藻毒素 LR,且加入的初始抗体库与两轮筛选后的噬菌体储备液的噬菌体量均为每孔  $10^{10}$  个噬菌体。因此 S/B 越高,代表整体噬菌体对微囊藻毒素 LR 的亲和力越高。如图 1 所示,初始抗体库对微囊藻毒素 LR 的亲和力较低,S/B 约为 1.1 倍,样品荧光信号接近背景信号,而经过第一轮筛选后噬菌体储备液的 S/B 略有提高,约为 1.4 倍,说明第一轮噬菌体储备液对微囊藻毒素 LR 的总体亲和力与初始抗体库相比有所提高。而第二轮筛选后,噬菌体储备液的 S/B 快速上升为 19.5 倍,说明经过第二轮筛选,噬菌体对微囊藻毒素 LR 的亲和力大大提高,富集作用明显,因此对此轮产出的噬菌体克隆提取单链抗体基因,与可溶性表达载体连接,

利用大肠杆菌表达,对分泌可溶性单链抗体的单个克隆进行下一步的鉴定。

[0035] 实施例 4. 单链抗体的可溶性表达与竞争型时间分辨荧光免疫分析法的对可溶性表达的单链抗体筛选鉴定

[0036] 由于筛选过程中的噬菌体对单链抗体的表达为展示型,被用于 2 轮亲和筛选过程。但是由于该噬菌体不能分泌可溶性的单链抗体片断,因此需要对单链抗体进行可溶性表达。因此对第二轮产出的噬菌体克隆提取总质粒 DNA,经过 Sfi I 酶切后胶回收得到单链抗体基因,与同样酶切后的可溶性表达的载体 pAK100CL 进行连接,连接后的载体电转化入大肠杆菌 XL1-Blue 中,稀释后涂布于含有四环素和氯霉素的 LA 琼脂平板。在该平板上随机挑取 90 个单菌落,用 IPTG 诱导表达单链抗体。用竞争型时间分辨免疫分析方法检测培养上清中的可溶性单链抗体,选择灵敏度最高的单链抗体,计算抑制中浓度,最低检测限和检测线性范围。

[0037] 竞争型时间分辨免疫分析方法的步骤如下:

[0038] (1) 将预先包被有羊抗鼠 IgG 的酶标板,用洗涤缓冲液洗涤 1 次。

[0039] (2) 取 20  $\mu$ l 单菌落诱导表达后的上清液与 80  $\mu$ l 检测缓冲液混合加入酶标板,100  $\mu$ l/孔。不加上清液孔作为空白对照孔。室温下,700rpm 振荡器上孵育 1h。洗涤缓冲液洗板 4 次。

[0040] (3) 酶标板 100  $\mu$ l/孔,分别加入 50  $\mu$ l 13nM 的 Eu 标记的微囊藻毒素 LR 的混合液和 50  $\mu$ l 检测缓冲液稀释的终浓度分别为 0,0.001,0.01,0.1,0.5,1,2.5,10  $\mu$ g/ml 的微囊藻毒素 LR 标样的混合液,每个浓度设三个重复。室温下,700rpm 振荡器上孵育 1h。洗涤缓冲液洗板 4 次。100  $\mu$ l/孔加入荧光增强液,室温下,700rpm 振荡器上孵育 45min,在多标记微孔板分析仪上进行读数。

[0041] 如图 2 所示,将不同浓度微囊藻毒素 LR 标准品对应的荧光信号结果,去除空白孔的本底荧光信号后,计算抑制率 (I)。以抑制率为纵坐标,标样浓度为横坐标绘制标准抑制曲线。并对检测线性范围进行回归分析,计算得到微囊藻毒素 LR 的浓度对数 (LgC) 与抑制率的线性回归方程为  $I = 26.41LgC + 59.540$  ( $R^2 = 0.948$ ),微囊藻毒素 LR 对单链抗体的抑制中浓度 ( $I_{50}$ ) 为 0.435  $\mu$ g/mL,最低检测限  $I_{10}$  为 0.013  $\mu$ g/mL,线性检测范围 ( $I_{20}$ - $I_{80}$ ) 在 0.031-5.952  $\mu$ g/mL 之间。

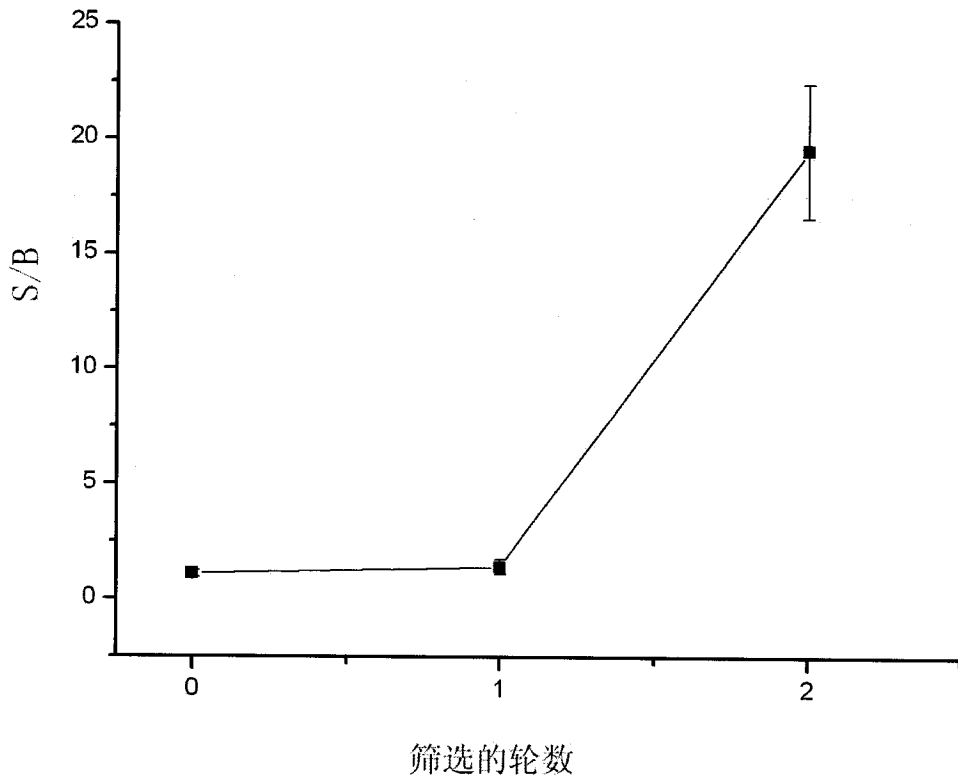


图 1

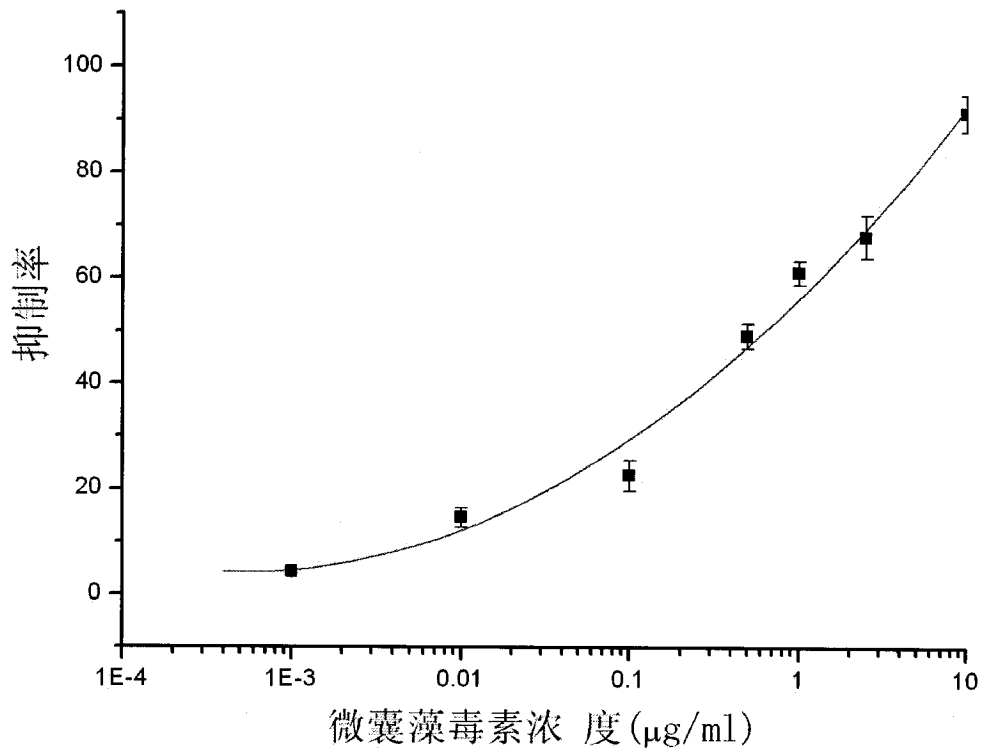


图 2

专利名称(译)	微囊藻毒素LR的单链抗体的筛选方法及其鉴定		
公开(公告)号	<a href="#">CN101857866B</a>	公开(公告)日	2013-04-24
申请号	CN201010156172.X	申请日	2010-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
[标]发明人	刘媛 刘贤金 梁颖 张存政 王耘 温爽		
发明人	刘媛 刘贤金 梁颖 张存政 王耘 温爽		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/70 C07K16/14 G01N33/53		
代理人(译)	孙忠浩		
审查员(译)	王超		
其他公开文献	CN101857866A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种微囊藻毒素LR的单链抗体的筛选方法及其鉴定。是将生物素化的微囊藻毒素LR利用亲和素标记磁珠和负筛选方法，在人源合成抗体库中进行两轮亲和筛选；再对第二轮产出的噬菌体克隆提取总质粒DNA，经过Sfi I酶切后胶回收得到单链抗体基因，与同样酶切后的可溶性表达的载体pAK100CL进行连接，连接后的载体电转化入大肠杆菌XL1-Blue中，获得可溶性表达的单链抗体；用竞争型时间分辨荧光免疫分析法，对可溶性表达的单链抗体进行鉴定。其优点是：本发明具有筛选快速简便，并能更好的将微囊藻毒素LR立体结构暴露于孵育体系中；同时对筛选结果的鉴定，具有检测信号高、抗基质干扰能力强的优点。

