



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103866401 A

(43) 申请公布日 2014.06.18

(21) 申请号 201410121842.2

G01N 33/53(2006.01)

(22) 申请日 2014.03.28

(71) 申请人 中国农业科学院油料作物研究所

地址 430062 湖北省武汉市武昌区徐东二路
2号

(72) 发明人 李培武 王妍入 张奇 张兆威
丁小霞

(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限
公司 42102

代理人 乔宇

(51) Int. Cl.

C40B 40/08(2006.01)

C40B 50/06(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C07K 16/14(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

序列表3页

(54) 发明名称

一种黄曲霉毒素纳米抗体基因库、构建方法、
用途及黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15

(57) 摘要

本发明涉及黄曲霉毒素纳米抗体基因库、
构建方法、用途及黄曲霉毒素 B1 纳米抗体
2014AFB-G15。所述黄曲霉毒素纳米抗体基因库
是通过提取免疫黄曲霉毒素 B1 抗原后的羊驼血
液中的 RNA, 并采用 RT-PCR 的方法特异性扩增羊
驼重链抗体可变区基因得到黄曲霉毒素纳米抗体
VHH 基因, 然后与 pCANTAB5E (his) 载体连接后转
化得到。本发明筛选得到的黄曲霉毒素 B1 纳米抗
体 2014AFB-G15 具有耐有机试剂、耐高温等特性,
稳定性好; 对黄曲霉毒素 B1 的 50% 抑制浓度 IC_{50}
为 0.66ng/mL, 对黄曲霉毒素 B2、G1、G2、M1 的交叉
反应率分别为 22.6%、0.95%、32.1% 和 26%。

1. 黄曲霉毒素纳米抗体基因库,其特征在于:提取经黄曲霉毒素 B1 抗原免疫后的羊驼血液中的 RNA,并采用 RT-PCR 的方法特异性扩增羊驼重链抗体 IgG2 和 IgG3 的可变区基因,即 VHH 基因,然后与 pCANTAB 5E (his)载体连接后转化得到;所述 pCANTAB 5E (his)载体是通过如下方法构建得到:以 pCANTAB5E 载体质粒为模板,通过上游引物:p5E SfiI-F:5'-ATGCGGCCAGCCGGCC-3' (SfiI);下游引物:p5E N-P-H-R: 5' - ATCGGGCCCTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCGCCCGTT TTC-3' PCR 扩增 pCANTAB5E 载体质粒上 Sfi I 到 NotI 之间的 DNA 片段,得到 p5E-his 片段;然后将 p5E-his 片段,先做 SfiI 单酶切再做 PspMI 单酶切,得 p5E-his(SfiI/PspMI) 粘性末端,将 pCANTAB5E 载体质粒先做 SfiI 单酶切再做 Not I 单酶切,得 p5E (SfiI/NotI)粘性末端;最后将 p5E-his (SfiI/PspMI) 粘性末端和 p5E (SfiI/NotI) 粘性末端连接后,得到 pCANTAB 5E (his) 载体。

2. 权利要求 1 所述的黄曲霉毒素纳米抗体基因库的构建方法,其特征在于,具体操作步骤为:对羊驼免疫黄曲霉毒素 B1 抗原,提取经免疫后羊驼血液中的 RNA,反转录为 cDNA,设计特异性引物,以 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增得到羊驼血液中重链抗体 IgG2 和 IgG3 的可变区基因,即 VHH 基因,然后将 VHH 基因与 pCANTAB 5E (his)载体连接后转化,构得黄曲霉毒素纳米抗体基因库。

3. 根据权利要求 2 所述的黄曲霉毒素纳米抗体基因库的构建方法,其特征在于:所述特异性引物的末端包含根据 pCANTAB 5E (his) 载体克隆位点附近序列设计的在 VHH 基因两端分别引入载体 pCANTAB 5E (his)同源序列的引物序列,每条特异性引物的末端至少包含 15bp 的载体 pCANTAB 5E (his) 同源位点,以在 VHH 基因两端各引入至少 15bp 的载体 pCANTAB 5E (his) 同源序列,所述特异性引物为:

R1: 5' -CGGCGCACCTGCGGCCGCATGGGGTCTTCGCTGTGGTGG CG -3'

F: 5'-TCCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCC CAGKTGCAGCTCGTGGAGTC-3'; 或

R2: 5' -CGGCGCACCTGCGGCCGCGTCTTGTGGTTTTGGTGTCTTG GG -3';

F: 5'-TCCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCC CAGKTGCAGCTCGTGGAGTC-3',其中横线部分表示的引物序列为与载体 pCANTAB 5E (his) 同源的位点。

4. 根据权利要求 2 所述的黄曲霉毒素纳米抗体基因库的构建方法,其特征在于:所述 PCR 扩增的反应体系为:

10× Ex taq Buffer	5 μ l
50mM MgSO ₄	2 μ l
10 mM dNTP	1 μ l
10 mM F 引物	1 μ l
10 mM R1 引物或 R2 引物	1 μ l
Ex taq DNA 聚合酶	0.1 μ l
cDNA 模板	2 μ l
ddH ₂ O 补至总体系	50 μ l ;

PCR 扩增程序为:94℃ 2min;94℃ 30s,55℃ 30s,68℃ 1min,扩增 30 个循环;68℃ 5min;其中,以 R1 为引物的 PCR 扩增反应次数:以 R2 为引物的 PCR 扩增反应次数为 2:3。

5. 根据权利要求 2 所述的黄曲霉毒素纳米抗体基因库的构建方法,其特征在于:所述 VHH 基因与 pCANTAB 5 E (his)载体的连接方法为:将 pCANTAB 5 E (his)载体经 Sfi I /

Not I 双酶切处理,然后与 VHH 基因进行 In-fusion 连接;所述的转化为:将前述连接产物加入到大肠杆菌 TG1 电转化感受态细胞中,混匀,电转化,电转化条件:0.1 cm 电转化杯,1.8 kV,200 Ω ,25 μ F,电转化后立即在电转化杯中加入 2YT 液体培养基吹打后转移,37°C 缓慢振荡复苏 1 h。

6. 权利要求 1 所述的黄曲霉毒素纳米抗体基因库在噬菌体展示方法筛选黄曲霉毒素 B1 纳米抗体的应用。

7. 根据权利要求 6 所述的黄曲霉毒素纳米抗体基因库在噬菌体展示方法筛选黄曲霉毒素 B1 纳米抗体的应用,其特征在于:它是将构建成功的黄曲霉毒素纳米抗体基因库通过 M13K07 辅助噬菌体拯救为展示在噬菌体衣壳表面的形式之后,通过吸附-洗脱的方法进行淘选,筛选出与黄曲霉毒素 B1 特异性结合而不和载体蛋白 BSA 结合的阳性孔,然后采用间接竞争 ELISA 法对第一步筛选出的阳性孔培养液进行检测,用黄曲霉毒素 B1 作为竞争原,选择灵敏度较高的克隆,最终筛选获得噬菌体展示的黄曲霉毒素 B1 纳米抗体。

8. 黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15,其特征在于,所述黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示,其编码基因序列如 SEQ ID NO:8 所示。

9. 根据权利要求 8 所述的黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15,其特征在于,其三个互补决定区的氨基酸序列分别为:CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示、CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示、CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示;三个互补决定区的编码基因序列分别为:CDR1 的编码基因序列如 SEQ ID NO:4 所示、CDR2 的编码基因序列如 SEQ ID NO:5 所示,CDR3 的编码基因序列如 SEQ ID NO:6 所示。

10. 根据权利要求 8~9 所述的黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 在对黄曲霉毒素 B1 的 ELISA 检测方面的应用。

一种黄曲霉毒素纳米抗体基因库、构建方法、用途及黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15

技术领域

[0001] 本发明涉及黄曲霉毒素纳米抗体基因库、构建方法、用途及黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素主要是由黄曲霉和寄生曲霉分泌产生的次生代谢产物,是能引起人畜各种损害的天然有毒化合物。黄曲霉毒素目前已发现 20 余种,其中黄曲霉毒素 B1 的毒性最强,它的毒性是氰化钾的 10 倍,砒霜的 68 倍。早在 1993 年,黄曲霉毒素 B1 被世界卫生组织的癌症研究机构划定为已知最强致癌化学物质之一,即 I 类致癌物质。我国属于黄曲霉毒素污染较重的地区,在各种食物及农产品,尤其是玉米、花生及其制品中都很有可能存在黄曲霉毒素的污染。因此加强黄曲霉毒素的检测、特别是速测,及时了解和掌握各种食物及农产品的卫生信息,对保障我国食品消费安全具有重要意义。

[0003] 现有黄曲霉毒素的检测方法包括化学分析法、精密仪器分析法和免疫学分析法。其中化学分析法是早期检测黄曲霉毒素最常用的检测方法,其不需要特殊的仪器设备,一般实验室都可进行,但试剂用量大、操作繁琐、其它组分干扰严重、准确性差,不能准确定量,且对实验人员和周围环境污染危害较大,不适于现场快速检测。精密仪器分析法包括荧光分光光度法和高效液相色谱法,其灵敏度高,准确性好,但仪器昂贵,要求黄曲霉毒素样品纯化程度高,样品前处理过程繁琐,耗时长,对实验环境要求高,难以实现快速检测。近些年发展起来的免疫分析技术克服了前两者的缺点,具有特异性强、灵敏度高、样品前处理简单、成本低、对实验人员和周围环境的污染危害小、适于现场批量检测等优点。免疫分析是利用抗原和抗体的特异性的结合反应和抗体、抗原上的标记物的生物、物理或化学放大作用来对超微量残留物进行定性、定量检测,所以要研究建立针对黄曲霉毒素的任何一种免疫学检测技术,都必须先制得抗黄曲霉毒素的抗体。

[0004] 随着抗体技术的发展,重组抗体在黄曲霉毒素的检测领域也逐渐被应用。与传统的多克隆抗体、单克隆抗体相比较而言,重组抗体具有其独特的优势,可以在原核表达体系里在很短的时间内大量生产并且生产费用低廉,对黄曲霉毒素的低成本、大规模检测有重要的应用价值,可以满足日益增长的黄曲霉毒素抗体的生产需要。纳米抗体是采用分子生物学手段,获得骆驼科动物体内的天然重链抗体可变区片段,并能与抗原特异性结合。目前,尚没有针对黄曲霉毒素 B1 的纳米抗体的相关报道。

发明内容

[0005] 本发明的发明目的是提供一种黄曲霉毒素纳米抗体基因库、构建方法、用途及黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15。

[0006] 为实现本发明目的,本发明采用如下技术方案:

黄曲霉毒素纳米抗体基因库,其特征在于:提取经黄曲霉毒素 B1 抗原免疫后的羊驼血

液中的 RNA, 并采用 RT-PCR 的方法特异性扩增羊驼重链抗体 IgG2 和 IgG3 的可变区基因, 即 VHH 基因, 然后与 pCANTAB 5E (his) 载体连接后转化得到。

[0007] 上述方案中, 所述 pCANTAB 5E(his)载体是通过如下方法构建得到: 以 pCANTAB5E 载体质粒为模板, 通过上游引物: p5E SfiI-F: 5' -ATGCGGCCAGCCGGCC-3' (Sfi I); 下游引物: p5E N-P-H-R: 5' - GATCGGGCCCTGTGGTGGTGGTGGTGGTGTGCG GCCGCCGTTTTC-3' PCR 扩增 pCANTAB5E 载体质粒上 Sfi I 到 NotI 之间的 DNA 片段, 得到 p5E-his 片段; 然后将 p5E-his 片段先做 SfiI 单酶切再做 PspMI 单酶切, 得 p5E-his(SfiI/PspMI) 粘性末端, 将 pCANTAB5E 载体质粒先做 SfiI 单酶切再做 Not I 单酶切, 得 p5E (SfiI/NotI) 粘性末端; 最后将 p5E-his(SfiI/PspMI) 粘性末端和 p5E (SfiI/NotI) 粘性末端连接后, 得到 pCANTAB 5E (his) 载体。

[0008] 黄曲霉毒素纳米抗体基因库的构建方法, 具体操作方法如下: 对羊驼免疫黄曲霉毒素 B1 抗原, 提取经免疫后羊驼血液中的 RNA, 反转录为 cDNA, 设计特异性引物, 以 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到羊驼血液中重链抗体 IgG2 和 IgG3 的可变区基因, 即 VHH 基因, 然后将 VHH 基因与 pCANTAB 5E (his) 载体连接后转化, 构得黄曲霉毒素纳米抗体基因库。

[0009] 上述方案中, 所述特异性引物的末端需包含根据 pCANTAB 5E (his) 载体克隆位点附近序列设计的在 VHH 基因两端分别引入载体 pCANTAB 5E (his) 同源序列的引物序列, 每条特异性引物的末端至少包含 15bp 的载体 pCANTAB 5E (his) 同源位点, 以在 VHH 基因两端各引入至少 15bp 的载体 pCANTAB 5E (his) 同源序列; 所述特异性引物为:

R1: 5' -CGGCGCACCTGCGGCCGCATGGGGTCTTCGCTGTGGTG CG -3'

F: 5'-TCCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCC CAGKTGCAGCTCGTGGAGTC-3'; 或

R2: 5' -CGGCGCACCTGCGGCCCGTCTTGTGGTTTTGGTGTCTTG GG -3'

F: 5' -TCCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCC CAGKTGCAGCTCGTGGAGTC-3', 其中横线

部分表示的引物序列为与载体 pCANTAB 5E (his) 同源的位点。

[0010] 上述方案中, 所述 PCR 扩增的反应体系为:

10× Ex taq Buffer	5 μ l
50mM MgSO ₄	2 μ l
10 mM dNTP	1 μ l
10 mM F 引物	1 μ l
10 mM R1 引物 (或 R2 引物)	1 μ l
Ex taq DNA 聚合酶	0.1 μ l
cDNA 模板	2 μ l
ddH ₂ O 补至总体系	50 μ l;

所述 PCR 扩增的程序为:

94°C 2min; 94°C 30s, 55°C 30s, 68°C 1min, 扩增 30 个循环; 68°C 5min;

其中, 以 R1 为引物的 PCR 扩增反应次数: 以 R2 为引物的 PCR 扩增反应次数为 2:3。

[0011] 上述方案中, 所述 VHH 基因与 pCANTAB 5 E (his) 载体的连接方法为: 将 pCANTAB 5 E(his) 载体经 Sfi I /Not I 双酶切处理, 然后与 VHH 基因进行 In-fusion 连接; 所述的转化为: 将前述连接产物加入到大肠杆菌 TG1 电转化感受态细胞中, 混匀, 电转化, 电转化条件: 0.1 cm 电转化杯, 1.8 kV, 200 Ω, 25 μ F, 电转化后立即在电转化杯中加入 2YT 液

体培养基吹打后转移,37°C缓慢振摇复苏 1 h。

[0012] 上述黄曲霉毒素纳米抗体基因库在噬菌体展示方法筛选黄曲霉毒素 B1 纳米抗体的应用。

[0013] 上述方案中,所述的噬菌体展示方法筛选黄曲霉毒素 B1 纳米抗体具体通过如下技术方案实现:将构建成功的黄曲霉毒素纳米抗体基因库通过 M13K07 辅助噬菌体拯救为展示在噬菌体衣壳表面的形式之后,通过吸附-洗脱的方法进行淘选,筛选出与黄曲霉毒素 B1 特异性结合而不和载体蛋白 BSA 结合的阳性孔,然后采用间接竞争 ELISA 法对第一步筛选出的阳性孔培养液进行检测,用黄曲霉毒素 B1 作为竞争原,选择灵敏度较高的克隆,最终筛选获得噬菌体展示的黄曲霉毒素 B1 纳米抗体。

[0014] 黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15,其氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示,编码基因序列如 SEQ ID NO:8 所示。其中三个互补决定区的氨基酸序列分别为:CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示、CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示、CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示;三个互补决定区的编码基因序列分别为:CDR1 的编码基因序列如 SEQ ID NO:4 所示、CDR2 的编码基因序列如 SEQ ID NO:5 所示,CDR3 的编码基因序列如 SEQ ID NO:6 所示。

[0015] 上述黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 在 ELISA 检测黄曲霉毒素 B1 方面的应用。

[0016] 本发明的有益效果在于:

(1) 本发明所述黄曲霉毒素纳米抗体基因库的构建方法简单;筛选得到的黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 具有耐有机试剂、耐高温等特性,稳定性好;

(2) 本发明提供的黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 对黄曲霉毒素 B1 的 50% 抑制浓度 IC_{50} 为 0.66ng/mL,对黄曲霉毒素 B2、G1、G2、M1 的交叉反应率分别为 22.6%、0.95%、32.1% 和 26%;

(3) 本发明提供的黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 可应用于对黄曲霉毒素 B1 的 ELLSA 检测,能有效降低样品提取液中有有机试剂等其他成分的干扰,从而提高检测准确度。

[0017] (4) 本发明提供的黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 为原核生物大肠杆菌表达,因此,能有效降低抗体生产成本。

具体实施方式

[0018] 实施例 1 黄曲霉毒素纳米抗体基因库的构建

1. 动物免疫

购买 2 岁的雄性羊驼一只,免疫黄曲霉毒素 B1 抗原(AFB₁-BSA, Sigma 公司)。将 200 μ g 黄曲霉毒素 B1 抗原与弗式不完全佐剂乳化后,对羊驼进行皮下多点注射。间隔 2 周免疫一次,每次免疫后 7-10 天对羊驼进行静脉取血,采用间接 ELISA 法测定血清效价,选取效价最高的一次免疫后,取血 10mL,提取总 RNA。

[0019] 2. cDNA 文库的构建

(1) 提取总 RNA:选取羊驼血清效价最高的一次免疫,免疫后 7-10 天,对羊驼进行静脉取血 10mL,提取总 RNA:采用 Life Technology 公司的 LeukoLOCK 总 RNA 分离试剂盒提取羊驼血液中的总 RNA。

[0020] (2) 合成 cDNA :以步骤 1 获得的总 RNA 为模板, oligo (dT)₁₅ 为引物, 按照 Promega 公司的反转录酶说明书进行反转录, 合成 cDNA 第一链, 获得 cDNA 文库。

[0021] 3. 黄曲霉毒素纳米抗体基因库的构建

(1) 以步骤 2 中合成的 cDNA 为模板, R1、F 或 R2、F 为引物, 进行 PCR 扩增得到羊驼重链抗体可变区基因, 即 VHH 基因: 取 cDNA 2 μl, 10×PCR Buffer 5 μl, MgSO₄ (50mM) 2 μl, dNTP (10mmol/L) 1 μl, F 引物 (10 μmol/L) 1 μl, R1 (或 R2) 引物 (10 μmol/L) 1 μl, DNA 酶 0.1 μl, 无菌纯水 37.9 μl 至 50 μl, 涡旋混匀, 短暂离心后, 进行 PCR 扩增反应, 反应条件为: 94℃变性 2min 后; 94℃变性 30s, 55℃退火 30s, 68℃延伸 1min, 30 个循环; 68℃延伸 5min。

[0022] R1: 5' -CGGCGCACCTGCGGCCGCATGGGGTCTTCGCTGTG GTGCG -3',

R2: 5' -CGGCGCACCTGCGGCCGCTCTTGTGGTTTTGGTGTCTTGG -3',

F: 5' -TCCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCC CAGKTGCAGCTCGTGGAGTC-3'; 其中横线部分表示的引物序列为与载体 pCANTAB 5E(his) 同源的位点; 以 R1、F 为引物进行 4 个 PCR 扩增反应, 以 R2、F 为引物进行 6 个 PCR 扩增反应。PCR 产物经过 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳分离后, 用试剂盒纯化回收 450bp 大小的 DNA 片段。

[0023] (2) pCANTAB 5E (his) 载体构建: 以 pCANTAB5E 载体质粒为模板, 通过上游引物: p5E SfiI-F: 5' -ATGCGCCCAGCCGGCC-3' (Sfi I); 下游引物: p5E N-P-H-R: 5' - GATCGGGCCCTGTGGTGGTGGTGGTGTGCGCCGCCGTTTC-3' PCR 扩增 pCANTAB5E 载体质粒上 Sfi I 到 NotI 之间的 DNA 片段, 得到 p5E-his 片段; 然后将 p5E-his 片段, 先做 SfiI 单酶切再做 PspMI 单酶切, 得 p5E-his(SfiI/PspMI) 粘性末端, 将 pCANTAB5E 载体质粒先做 SfiI 单酶切再做 Not I 单酶切, 得 p5E (SfiI/NotI) 粘性末端; 最后将 p5E-his(SfiI/PspMI) 粘性末端和 p5E (SfiI/NotI) 粘性末端连接后, 得到 pCANTAB 5E (his) 载体。

[0024] (3) 双酶切处理 pCANTAB 5 E (his):

Sfi I 单酶切:

按照如下体系配制反应液: pCANTAB 5 E (his) vector	30 μl
Sfi I	1 μl
10×M Buffer	10 μl
ddH ₂ O 补至总体系	100 μl

50℃水浴 2 h 后用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒进行回收。

[0025] Not I 酶切:

按照如下体系配制反应液:

pCANTAB 5 E (his) Sfi I 单酶切回收产物	30 μl
Not I I	1 μl
10×H Buffer	10 μl
ddH ₂ O 补至总体系	100 μl

37℃水浴 4 h 后用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒进行回收;

(4) VHH 基因与双酶切处理的 pCANTAB 5 E (his) 载体的连接

按照如下体系进行 In-Fusion 连接:

Sfi I /Not I 双酶切处理的 pCANTAB 5 E (his) vector	120ng
--	-------

VHH 基因	40ng
5×In-Fusion buffer	2 μ l
In-Fusion Enzyme	1 μ l
ddH ₂ O 补至总体积	10 μ l

37℃水浴 15min 后,放入 50℃水浴 15min,水浴后立即放在冰上 5min,加入 40 μ l TE 缓冲液,用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒进行回收,-20℃保存待用。

[0026] (5) 连接产物的电转化

将上述连接产物取 5 μ l 加入到 50 μ l *E. coli* TG1 电转化感受态细胞中,混匀后,加入到预冷的 0.1 cm 电转化杯 (Bio-RAD) 中,冰上放置 10min,然后放在 Bio-rad 电转化仪上进行电转化,电转化条件:1.8 kV,200 Ω,25 μ F,电转化后立即在电转化杯中加入 1 mL 2YT 液体培养基吹打后转移至一灭菌后的干净 15 mL 摇菌管中,37℃缓慢振荡复苏 1 h。取 2 μ l 菌液倍比稀释后涂布于 LB 氨苄平板上,37℃倒置过夜,第二天数菌落个数计算库容量。

[0027] (6) 黄曲霉毒素纳米抗体基因库的拯救:共进行十次上述的电转化,将复苏后的菌液全部转入 200mL SB 培养基中,于 37℃ 250rpm 振荡至 OD₆₀₀ 值为 0.5 时,加入 1mL,1×10¹² pfu 的辅助噬菌体 M13K07,37℃静置 1h 后,继续振荡 2h,加入卡那霉素至终浓度为 70 μ g/mL,并振荡过夜。次日,将过夜菌于 4℃ 10000rpm 离心 15min,将上清转移至无菌的离心瓶中,加入 1/4 体积的 5x PEG/NaCl,于冰上静置 2h 后,4℃ 12000rpm 离心 20min,用 10mL 无菌的重悬溶液(含 1×蛋白酶抑制剂,0.02% NaN₃ 和 0.5% BSA 的 PBS 缓冲液)溶解沉淀得到拯救后的黄曲霉毒素纳米抗体基因库。

[0028] 实施例 2 黄曲霉毒素 B1 纳米抗体的筛选以及序列测定

1. 黄曲霉毒素 B1 纳米抗体的淘选

用 AFB₁-BSA (1 μ g/孔) 及 3% 的 BSA-PBS 溶液(用作阴性对照) 分别包被 ELISA 板,4℃过夜;次日,倾掉包被液后,PBST 洗板 3 次,然后用 3%脱脂奶粉封闭 1 h;PBST 洗板 3 次,在包被有 AFB₁-BSA 的孔中加入上述拯救后的黄曲霉毒素纳米抗体基因库 50 μ l,37℃孵育 1 h;PBST 洗板 10 次后,每孔加入 100 μ l、100ng/mL AFB₁ 溶液,室温(20℃~30℃)震荡 30min 洗脱。将洗脱液转至包被有 3%BSA-PBS 溶液的孔中,37℃孵育 1h (去除非特异性吸附);孵育后,取上清侵染 2mL 生长至对数期的 TG1 菌液,37℃侵染 20min,取 1 μ l、10 μ l 分别涂布 LB 氨苄平板上,并于 37℃培养箱中静置过夜,次日数平板上的菌落数确定洗脱液中噬菌体滴度。另将上述剩余的被侵染后的 TG1 菌液转入 6mLSB 培养基中,加 100mg/mL 的氨苄青霉素 1.5 μ l,37℃振荡 1h,补加氨苄青霉素至终浓度为 50 μ g/mL,继续振荡 1h 后,加入 1mL 辅助噬菌体 M13K07 (1×10¹² pfu/mL),37℃静置 30min,转入 100mL SB 培养基,补加氨苄青霉素(100mg/mL)46 μ l,继续振荡 2h 后,加入卡那霉素至终浓度为 70 μ g/mL,并于 37℃振荡过夜。次日,将菌液于 10000rpm 4℃离心 15min,转移上清,并加入 1/4 体积 PEG/NaCl 溶液,于冰上孵育 2h,12000rpm 4℃离心 20min,用 1%BSA-PBS 溶液溶解沉淀,得到第一轮淘选扩增产物,并用于下一轮淘选。在随后几轮的淘选中,包被抗原 AFB₁-BSA 的浓度分别为 0.5 μ g/孔、0.1 μ g/孔、0.05 μ g/孔,洗脱液分别为 500ng/mL、100ng/mL、50ng/mL 的 AFB₁ 溶液。

[0029] 2. 阳性克隆的鉴定:

经过 4 轮淘选后,取 2 μ l 洗脱液倍比稀释后侵染生长至对数期的 TG1 菌液,涂布 LB 氨苄平板上,37 $^{\circ}$ C 倒置过夜。次日,随机挑取 30 个克隆分别于 3mL SB- 氨苄培养基中,37 $^{\circ}$ C 震荡培养 6-8h,至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右,加入 30 μ l 辅助噬菌体 M13K07 (1×10^{12} pfu/mL),37 $^{\circ}$ C 静置 30min 后继续振荡 2h,加入卡那霉素至终浓度为 70 μ g/mL,并震荡培养过夜;次日,将菌液于 10000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 15min 后,得到菌液上清。

[0030] 用包被液配制 AFB₁-BSA 至终浓度 0.2 μ g/ml,包被 96 孔 ELISA 板,每孔 100 μ l,同时另取 ELISA 板,其中的 32 个孔用 3%BSA 包被,4 $^{\circ}$ C 包被过夜;次日,倾掉包被液后,PBST 洗板 3 次,然后用 3%脱脂奶粉-PBS 封闭 1 h;取 AFB₁ 标准品储存液,用 10% 甲醇/PBS 配制成 100ng/mL、0ng/mL 的工作液,分别加入到包被有 AFB₁-BSA 抗原的孔中,再每孔加入 50 μ l 上述菌液上清,每种工作液浓度重复 3 次;在包被有 BSA 的孔加入 10% 甲醇/PBS 和 50 μ l 上述菌液上清作为对照,轻摇板子混匀后,置 37 $^{\circ}$ C 温箱反应 1 h;PBST 洗板 10 次后,每孔加入 100 μ l 用 PBS 按 1:5000 比例稀释的 HRP/ANTI-M13,37 $^{\circ}$ C 保温 1 h;PBST 洗板 6 次,每孔加入 100 μ l 新鲜配制的 TMB 底物溶液,37 $^{\circ}$ C 保温 15 min;加 2mol/L H₂SO₄,每孔 50 μ l 中止反应,用酶标仪分别测定 OD₄₅₀ 值;对 BSA 不吸附,对 AFB₁-BSA 有吸附,并且加入黄曲霉毒素后存在竞争的即为阳性噬菌体克隆,由此筛选得到吸光值和灵敏度均较高的孔,得到噬菌体展示的黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15。

[0031] 3. 黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 的特性及测序分析结果如下:

采用间接竞争 ELISA 方法测定黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 的抗体特异性,具体用交叉反应率描述,测试方法如下:将 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 和 AFM₁ 五种不同标准品储存液,用 10% 甲醇/PBS 梯度稀释至十个不同的工作浓度,同等条件下采用间接竞争 ELISA 方法进行测定,依次绘制五种黄曲霉毒素的竞争 ELISA 曲线,求出各自抑制率为 50% 时的标准品浓度,用 IC₅₀ 表示,并根据下述计算公式计算交叉反应率:交叉反应率(%)=(AFB₁IC₅₀/类似物 IC₅₀) \times 100%,所述类似物为 AFB₂、AFG₁、AFG₂ 或 AFM₁,得到黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 对于对黄曲霉毒素 B1 的 50% 抑制浓度 IC₅₀ 为 0.66ng/mL,对黄曲霉毒素 B2、G1、G2、M1 的交叉反应率分别为 22.6%、10.95%、32.1% 和 26%。因此,黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 是一种抗黄曲霉毒素 B1 的特异性纳米抗体。经耐受性试验,黄曲霉毒素纳米抗体 2014AFB-G15 比常规鼠源与兔源抗体耐有机溶剂能力提高 35%,耐高温能力提高 46%,因此能有效降低检测时样品提取液中有有机溶剂等其他成分的干扰,从而提高检测灵敏度。

[0032] 黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 的特征性序列测定:将筛选到的黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 的克隆菌液送至上海桑尼科技有限公司进行测序分析,测序引物为噬菌体载体通用引物 R1 :5'-CCA TGA TTA CGC CAA GCT TTG GAG CC-3'。得到黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:7 所示,编码基因序列为 SEQ ID NO:8 所示,其中三个互补决定区的氨基酸序列分别为:CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示、CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示、CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示;三个互补决定区的编码基因序列分别为:CDR1 的编码基因序列如 SEQ ID NO:4 所示、CDR2 的编码基因序列如 SEQ ID NO:5 所示,CDR3 的编码基因序列如 SEQ ID NO:6 所示。

[0033] 实施例 3 黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 的制备

(1)获得能分泌黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 的 TG1 菌液,使用 Qiagen 的 DNA 小量提取试剂盒提取质粒,转化到 HB2151 感受态细胞中,并涂布到 LB 氨苄平板上;

(2) 挑取含有黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 质粒的 HB2151 菌落于 100mLSB 氨苄液体培养基中, 250 rpm, 37°C 培养至 OD600 = 0.5-0.8, 加入 200 μl 0.5M IPTG 溶液诱导过夜。

[0034] (3) 4°C, 10 000 rpm, 冷冻离心 15 min, 无菌操作台中小心去除上清, 菌体沉淀采用渗透休克法进行可溶性蛋白提取, 得到上清蛋白。将上清蛋白过 0.22μm 滤膜后, 用平衡缓冲液(50mM 磷酸盐, 300mM 氯化钠, 20mM 咪唑; pH 7.4) 透析过夜。

[0035] (4) 采用 His60 镍柱(Clontech Technology) 纯化抗体: 首先用 10 倍柱体积的平衡缓冲液冲洗镍柱, 将步骤(3) 中透析后的上清蛋白进样 His60 镍柱(Clontech Technology) 进行抗体纯化, 用 10 倍柱体积淋洗缓冲液(50mM 磷酸盐, 300mM 氯化钠, 40mM 咪唑; pH 7.4) 洗涤柱子, 最后用 10 倍柱体积的洗脱缓冲液(50mM 磷酸盐, 300mM 氯化钠, 300mM 咪唑; pH 7.4) 洗脱抗体 2014AFB-G15, 收集洗脱液, 装入透析袋, 用 0.01M, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 2-3 天后浓缩, 分装于 -20°C 保存备用。

[0036] 实验例 4 黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 的应用

1. 样品前处理:

称取 5g 不含黄曲霉毒素的玉米、花生、植物油、饲料空白样品各三份, 分别加标 AFB₁ 10μg/kg, 50μg/kg, 100μg/kg, 用 15mL 70% 的甲醇水溶液于 50°C 超声提取 10min, 静置后取上清, 用 0.01M, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 5 倍后待用。

[0037] 2. 间接竞争酶联免疫分析

用包被缓冲液配制 0.25 μg/mL AFB₁-BSA 溶液, 加入 ELISA 微孔板中, 100 μL/孔, 4°C 过夜。次日, PBST 洗板三次后, 用 200 μL 溶于 PBS 的 3% 脱脂奶粉封闭微孔, 37°C 恒温箱反应 1h。PBST 洗板三次, 每孔加入 50 μL 黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15(1.26μg/mL) 和 50 μL AFB₁ 标准溶液或待测样品。37°C 反应 1h 后, PBST 洗板三次, 每孔加入 100 μL, 用 PBS 按 1:5000 稀释的兔抗 E tag 酶标二抗, 37°C 反应 1 小时。PBST 洗板六次后, 每孔加入 100 μl 新鲜配制的 TMB 底物溶液, 37°C 保温 15 min; 再加入 50μL 2 M 硫酸终止反应, 立即用酶标仪在 450nm 下测定吸光值。根据样品测定的吸光值计算样品中 AFB₁ 的浓度, 判断方法回收率。玉米、花生、植物油、饲料四个样品的平均回收率分别为 92.8%、88.7%、97.3%、90.2%, 可满足黄曲霉毒素检测对方法准确度的需求。

[0038] 综上, 黄曲霉毒素 B1 纳米抗体 2014AFB-G15 能有效识别黄曲霉毒素 B1, 可应用于黄曲霉毒素 B1 的 ELISA 检测等, 对食品安全领域黄曲霉毒素监控有重要意义。

序列表

<110> 中国农业科学院油料作物研究所

<120> 一种黄曲霉毒素纳米抗体基因库、构建方法、用途及黄曲霉毒素 B1 纳米抗体
2014AFB-G15

<160>8

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 羊驼

<400>1

Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1

5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 羊驼

<400>2

Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser

1

5

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 羊驼

<400>3

Ala Ala Gly Phe Ser Gly Asn Tyr Tyr Arg Thr Pro Asp Tyr

1

5

10

14

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> 羊驼

<400> 4

ggacgcacct tcagtagcta cgcc 24

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 羊驼

<400> 5

attagctgga gtggtggtag c 21

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> 羊驼

<400> 6

gcagctggct ttagtggtaa ttactaccgc acaccggact ac 42

<210> 7

<211> 130

<212> PRT

<213> 羊驼

<400> 7

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser

20 25 30

Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg

35 40 45

Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr

50 55 60

Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Asn Arg Asp Asn Ala

65 70 75

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp		
	80	85
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Phe Ser Gly Asn Tyr Tyr		
	95	100
Arg Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser		
	110	115
Ser Glu Pro Lys Thr Pro Lys Pro Gln Asp		
	125	130

<210> 8

<211> 390

<212> DNA

<213> 羊驼

<400> 8

cagttgcagc tcgtggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggacg caccttcagt agctacgcca tgggctgggt ccgccagget	120
ccaggaagg agcgtgagtt tgtageggct attagctgga gtggtggtag cacatactat	180
acagactccg tgaagggccg attcaccatc aacagagaca acgccaagaa cacggtgtat	240
ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc agctggcttt	300
agtggttaatt actaccgcac acccgactac tggggccagg ggacccaggt caccgtctcc	360
tcagaacca agacacaaa accacaagac	390

专利名称(译)	一种黄曲霉毒素纳米抗体基因库、构建方法、用途及黄曲霉毒素B1纳米抗体2014AFB-G15		
公开(公告)号	CN103866401A	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	CN201410121842.2	申请日	2014-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
[标]发明人	李培武 王妍入 张奇 张兆威 丁小霞		
发明人	李培武 王妍入 张奇 张兆威 丁小霞		
IPC分类号	C40B40/08 C40B50/06 C12N15/13 C12N15/63 C07K16/14 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/14 C07K2317/22 C07K2317/569 C07K2317/92 C07K2317/94		
代理人(译)	乔宇		
其他公开文献	CN103866401B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及黄曲霉毒素纳米抗体基因库、构建方法、用途及黄曲霉毒素B1纳米抗体2014AFB-G15。所述黄曲霉毒素纳米抗体基因库是通过提取免疫黄曲霉毒素B1抗原后的羊驼血液中的RNA，并采用RT-PCR的方法特异性扩增羊驼重链抗体可变区基因得到黄曲霉毒素纳米抗体VHH基因，然后与pCANTAB5E (his) 载体连接后转化得到。本发明筛选得到的黄曲霉毒素B1纳米抗体2014AFB-G15具有耐有机试剂、耐高温等特性，稳定性好；对黄曲霉毒素B1的50%抑制浓度IC50为0.66ng/mL，对黄曲霉毒素B2、G1、G2、M1的交叉反应率分别为22.6%、0.95%、32.1%和26%。