



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107163142 A

(43)申请公布日 2017.09.15

(21)申请号 201710265436.7

(22)申请日 2015.12.02

(62)分案原申请数据

201510866731.9 2015.12.02

(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 涂追 许杨

(51)Int.Cl.

C07K 16/14(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表8页

(54)发明名称

一种能特异性结合黄曲霉毒素的纳米抗体

(57)摘要

本发明属于生物技术领域,涉及单域重链抗体技术,具体为针对黄曲霉毒素的单域重链抗体,其具有SEQ ID NO.:11等所示的氨基酸序列。该抗体具有耐酸碱、耐高温以及易于生产等特性,对于黄曲霉毒素的低成本、可重复使用的免疫学检测方法有重要的实用价值。

1. 针对黄曲霉毒素的单域重链抗体,具有SEQ ID NO.:11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,其特征在于具有SEQ ID NO.:12核酸序列。
4. 包含权利要求2所述的核酸序列的载体。
5. 包含权利要求4所述载体的宿主细胞。
6. 权利要求1所述的针对黄曲霉毒素的单域重链抗体在免疫检测、黄曲霉毒素富集以及纯化中的应用。
7. 权利要求1所述的针对黄曲霉毒素的单域重链抗体在制备黄曲霉毒素免疫检测、富集以及纯化试剂或材料中的应用。
8. 权利要求1所述的针对黄曲霉毒素的单域重链抗体通过随机或定点突变技术进行改造所获得的能与黄曲霉毒素特异性结合的抗体。

一种能特异性结合黄曲霉毒素的纳米抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及单域重链抗体技术(又称纳米抗体技术),以及基因工程抗体技术,特别是针对黄曲霉毒素的单域重链抗体或多肽。

技术背景

[0002] 黄曲霉毒素(Aflatoxin)是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)、集蜂曲霉(*Aspergillus nomius*)和溜曲霉(*Aspergillus tamarii*)等真菌产生的次级代谢产物,具有强致癌性和强免疫抑制性。黄曲霉毒素是一类化学结构类似的二呋喃香豆素衍生物,主要包括黄曲霉毒素B₁(AFB₁)、B₂(AFB₂)、G₁(AFG₁)、G₂(AFG₂)和M₁(AFM₁)等。在已发现的黄曲霉毒素中,黄曲霉毒素B₁的毒性最强,被世界卫生组织的癌症研究机构划定为I类致癌物。产毒真菌菌株广泛存在于自然界中,粮食油料等农产品在生产、加工以及储藏等过程中均可能受到污染,导致黄曲霉毒素超标。我国是黄曲霉毒素污染情况较为严重的地区。因此,开发稳定、快速、高灵敏、高通量的黄曲霉毒素检测方法,对于保障我国食品安全、减少由此带来的损失具有重要意义。

[0003] 现有的黄曲霉毒素检测方法主要有免疫分析法、仪器分析法以及薄层层析法。其中免疫分析法可避免其它两类方法存在的一些缺陷,具有灵敏度高、成本低以及可现场检测等优点。免疫分析法的原理是基于抗原抗体的特异性识别,抗体的性能是免疫分析方法灵敏度、准确度等指标的决定性因素。因此获得针对黄曲霉毒素的抗体是建立相关免疫学检测技术的前提和关键。

[0004] 单域重链抗体(又称纳米抗体)是由羊驼重链抗体的可变区组成,又称为纳米抗体,具有耐酸碱、耐高温以及易于生产等特性。这些特性对于黄曲霉毒素的低成本、可重复使用的免疫学检测方法有重要的实用价值。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供针对黄曲霉毒素的单域重链抗体,可以被用于制备检测黄曲霉毒素的试剂和工具。

[0006] 本发明提供一个针对黄曲霉毒素的单域重链抗体(即本发明一种能特异性结合黄曲霉毒素的纳米抗体,下同),具有SEQ ID NO.:1、SEQ ID NO.:3、SEQ ID NO.:5、SEQ ID NO.:7、SEQ ID NO.:9、SEQ ID NO.:11、SEQ ID NO.:13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)。

[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、SEQ ID NO.:3、SEQ ID NO.:5、SEQ ID NO.:7、SEQ ID NO.:9、SEQ ID NO.:11、SEQ ID NO.:13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。对应的,可以为SEQ ID NO.:2、SEQ ID

NO.:4、SEQ ID NO.:6、SEQ ID NO.:8、SEQ ID NO.:10、SEQ ID NO.:12、SEQ ID NO.:14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] 本发明还提供一种检测黄曲霉毒素的方法,含有本发明所述针对黄曲霉毒素的单域重链抗体。基于本发明提供的针对黄曲霉毒素的单域重链抗体与黄曲霉毒素特异性结合的能力,建立黄曲霉毒素的检测方法。其中,优选的方法包括酶连免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA),荧光免疫法(Fluoroimmunoassay,FIA),免疫芯片法,亲和层析法和免疫层析法等。

[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。

[0015] 本发明还涉及前述针对黄曲霉毒素的单域重链抗体在免疫检测、黄曲霉毒素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] 本发明所叙述的一些术语具有如下含义:

[0017] 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。

[0018] 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(Ehrenman,F.,Q.Kaas,et.al.(2010).IMGT/3D structure-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 Igsuperfamily V-like domains Dev comp Immunol 27(1):55-77.)中的描述。

[0019] 密码子(codon):又称为三连体密码子(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。

具体实施方式

[0020] 下面通过单域重链抗体(多肽)的制备、分析及应用,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。

[0021] 实施例1:

[0022] 抗黄曲霉毒素单域重链抗体(即针对黄曲霉毒素的单域重链抗体)免疫文库的构建

[0023] 将黄曲霉毒素B₁与匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin,KLH)共价偶联,得到黄曲霉毒素人工抗原AFB₁-KLH,取300μg AFB₁-KLH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 AFB₁-KLH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。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 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。

[0027] 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'-tcgcggccagccgcccagcagcCAGKTGCAGCTCGTGGAGTCNGGNGG- 3'
[0028] AlpVHHR1-NotI	5'- cgagtgcggccgcGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG- 3'
AlpVHHR2-NotI	5'- cgagtgcggccgcTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG- 3'
CH ₂ -R	5'- GGTACGTGCTGTGAAGTGTTC- 3'
M13-R	5'- AGCGGATAACAATTCACACAGGA- 3'
pHEN-R	5'- GCCCCATTTCAGATCCTCTTC- 3'

[0029] 注:下划线表示限制性内切酶识别序列

[0030] 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,37℃,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×24cm氨苄青霉素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。

[0031] 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),即得到抗黄曲霉毒素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。

[0032] 实施例2:

[0033] 抗黄曲霉毒素单域重链抗体的淘选与鉴定

[0034] 采用固相亲和淘选的方法从实施例1所得抗黄曲霉毒素单域重链抗体免疫文库文库中淘选针对黄曲霉毒素的单域重链抗体。将AFB₁与卵清白蛋白(albumin,OVA)共价偶联,得到人工抗原AFB₁-OVA。每孔加入100μL用PBS稀释的人工抗原AFB₁-OVA,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噬菌体抗体文库(约含2×10¹¹CFU),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5次),再用PBS洗板10次(洗板次数逐轮增加5次);以100 μ L洗脱液(甘氨酸-盐酸,pH2.2)洗脱吸附在酶标孔中的噬菌体,用50 μ L Tris-HCl(1mol/L,pH 8.0)中和洗脱物,取10 μ L用于滴度测定,其余洗脱物扩增后用于下一轮淘选。第二轮和第三轮淘选采用竞争洗脱,分别用50和25ng/mL的AFB₁溶液在37 $^{\circ}$ C,孵育1h。

[0035] 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phage-ELISA和间接竞争phage-ELISA测定噬菌体颗粒的结合活性和特异性,实验设定阴性对照及背景对照,具体加样步骤见表2。

[0036] 表2间接phage-ELISA加样表

	实验组	加标竞争	背景对照	空白对照 a
包被	AFB ₁ -OVA	AFB ₁ -OVA	OVA	AFB ₁ -OVA
封闭	1 \times Blocking buffer (3%脱脂牛奶 W/V)			
[0037] 结合	噬菌体	噬菌体+ 黄曲霉毒素标准品	噬菌体	PBS
二抗	HRP/anti-M13			

[0038] 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,其编码针对黄曲霉毒素的单域重链抗体,具体如下:

[0039] G8 (SEQ ID NO.:2):

[0040] CAGTTGCAGCTCGTGGAGTCAGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGACTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGACGCACCGGCACAATCTATGGCATGGGCTGGTTCGCGAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGC
GACTCTTTGGTGGACTGTTGGTGCCCCATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCTAGAGACAACG
ACAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCACGTATTACTGTGCATTAGATAAC
CGCCGCAGTTATGTTGATTACCACTCCGTAAGTGAGTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC
A

[0041] G4 (SEQ ID NO.:4):

[0042] CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTCTACGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGACGCACCGGCACAATCTATGGCATGGGCTGGTTCGCGAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGC
GACTATTTGGTGGACTGTTGGTGCCCCATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCTAGAGACAACG
ACAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCATTAGATAAC
CGCCGCAGTTATGTTGATTACTACTCCGTAAGTGAGTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC
A

[0043] D7: (SEQ ID NO.:6):

[0044] CAGTTGCAGCTCGTGGAGTCCGGTGGAGGCTTGGTGCAGGTTGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGACGCACCGGCACAATCTATGGCATGGGCTGGTTCGCGAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGC
AACTATTTGGTGGACTGTTGGTGCTCCATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCTAGAGACAACG
CCAAGAACACGGTATATCTGCAAATGAATAGCCTGAAAGTTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCATTAGATAAC

CGCCGCAGTTATGTTAATTACTACTCCTCAAGTGAGTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC
A

[0045] C6: (SEQ ID NO.:8) :

[0046] CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTACA
GCCTCTGGACGCACCGGCACAATCTATGGCATGGGCTGGTTCCGCGAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTTC
GACTATTTGGTGGACTGTTGGTGCCCCATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCTAGAGACAACG
ACAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCATTAGATAAT
CGCCGCAGTTATGTTGATTACCACTCCGTAAGTGAGTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC
A

[0047] H4: (SEQ ID NO.:10) :

[0048] CAGTTGCAGCTCGTGGAGTCGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTACA
GCCTCTGGACGCACCGGCACAATCTATGGCATGGGCTGGTTCCGCGAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTTC
GACTATTTGGTGGACTGTTGGTGCCCCATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCTAGAGACAACG
ACAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCATTAGATAAT
CGCCGCAGTTATGTTGATTACCACTCCGTAAGTGAGTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC
A

[0049] H8: (SEQ ID NO.:12) :

[0050] CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCGGGGGAGGAGCGGTGCAGGCTGGGGGCTCTTTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGACGCACCGGCACAATCTATGGCATGGGCTGGTTCCGCGAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTTC
GACTATTTGGTGGACTTTTGTATGCCCCATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGTCGATTACCATCTCTAGAGACAACG
ACAAGAACACGGTGTATCTACAAATGAACAACCTGAGCCCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCATTAGATAAT
CGCCGCAGTTATGTTGATTACCGCTCCGTAAGTGAGTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC
A

[0051] E12: (SEQ ID NO.:14) :

[0052] CAGTTGCAGCTCGTGGAGTCGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGCTCTCTCACACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGACGCACCTTCACAACGTATGGCATGGGCTGGTTCCGCGAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGC
AACTATGTGGTGGACTGTTGGTGCCCCATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCACTAGAGACAGCG
CCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGTTAGATAAC
CGCCGCAGTTATGTTGATTACCGCTCCTCAAGTGAGTATGATTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC
A

[0053] 依据DNA测序结果及密码子表可获得相应的针对黄曲霉毒素的单域重链抗体的氨
基酸序列:

[0054] G8 (SEQ ID NO.:1) :

[0055] QLQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTGTIYGMGWFREAPGKEREFVATLWWTVGAPYYADSVKGRFT
ISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTATYYCALDNRRSYVDYHSVSEYDYWGQGTQVTVSS

[0056] G4 (SEQ ID NO.:3) :

[0057] QVQLVESGGGLVQAGGSTRLSCAASGRTGTIYGMGWFREAPGKEREFVATIWWTVGAPYYADSVKGRFT
ISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCALDNRRSYVDYYSVSEYDYWGQGTQVTVSS

[0058] D7: (SEQ ID NO.:5) :

[0059] QLQLVESGGGLVQVGGSLRLSCAASGRTGTIYGMGWFREAPGKEREVATIWWTVGAPYYADSVKGRFT
ISRDNKNTVYLQMNLSKVEDTAIYYCALDNRRSYVNYSSSEYDYWGQGTQVTVSS

[0060] C6: (SEQ ID NO.:7) :

[0061] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTGTIYGMGWFREAPGKEREVATIWWTVGAPYYADSVKGRFT
ISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAIYYCALDNRRSYVDYHSVSEYDYWGQGTQVTVSS

[0062] H4: (SEQ ID NO.:9) :

[0063] QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTGTIYGMGWFREAPGKEREVATIWWTVGAPYYADSVKGRFT
ISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAIYYCALDNRRSYVDYHSVSEYDYWGQGTQVTVSS

[0064] H8: (SEQ ID NO.:11) :

[0065] QVQLVESGGGAVQAGGSLRLSCAASGRTGTIYGMGWFREAPGKEREVATIWWTFDAPYYADSVKGRFT
ISRDNKNTVYLQMNLSPEDTAIYYCALDNRRSYVDYRSVSEYDYWGQGTQVTVSS

[0066] E12: (SEQ ID NO.:13) :

[0067] QLQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASGRTFTTYGMGWFREAPGKEREVATMWWTVGAPYYADSVKGRFT
ITRDSAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCALDTRRSYVDYRSSSEYDYWGQGTQVTVSS

[0068] 采用间接竞争phage-ELISA法对阳性克隆与几种不同黄曲霉毒素亚型的交叉反应率进行测定,将AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂和AFM₁五种标准品稀释至12个不同的工作浓度,在同样的条件下进行间接竞争phage-ELISA测定,分别绘制竞争ELISA曲线,计算抑制率为50%时的标准品浓度(IC₅₀),按照公式:交叉反应率(%)=(AFB₁IC₅₀/类似物IC₅₀)×100%,所述类似物为AFB₂、AFG₁、AFG₂或AFM₁,得到本发明阳性克隆(针对黄曲霉毒素的单域重链抗体)对于AFB₁的50%抑制浓度。结果表明,本发明阳性克隆(针对黄曲霉毒素的单域重链抗体)对于AFB₁具有较好的特异性,对AFG₁和AFG₂也有一定的结合能力。

[0069] 实施例3:

[0070] 抗黄曲霉毒素单域重链抗体的规模制备

[0071] 编码抗AFB₁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-抗AFB₁单域重链抗体基因,琼脂糖凝胶电泳回收抗AFB₁单域重链抗体基因;2.直接将抗AFB₁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。

[0072] 将得到的抗AFB₁单域重链抗体基因片段克隆至表达载体pET25,经PCR和酶切鉴定,构建完成抗AFB₁单域重链抗体的大肠杆菌表达质粒。

[0073] 将表达质粒转化至大肠杆菌BL21,挑取单菌落进行诱导表达。将单菌落接入4mL LBA(Luria-Bertani broth with 100μg/mL ampicillin)液体培养基中,37℃、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℃、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℃、200r/min诱导培养。

[0074] 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℃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℃冰柜待用。

[0075] 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AFB₁单域重链抗体提供了途径。

[0076] 实施例4:

[0077] 抗黄曲霉毒素单域重链抗体的融合表达

[0078] 将本发明抗AFB₁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AFB₁单域重链抗体的碱性磷酸酶融合表达质粒。

[0079] 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。融合表达质粒将抗AFB₁单域重链抗体融合于碱性磷酸酶的N端,参考应用实例2中的表达方法,可以在大肠杆菌中表达、纯化出融合蛋白AP-抗AFB₁单域重链抗体基因。

[0080] 实施例5:

[0081] 抗黄曲霉毒素单域重链抗体用于黄曲霉毒素B₁的检测

[0082] 样品准备:称取不含黄曲霉毒素的花生、玉米样品各三份,分别加入AFB₁标准品10 μg/kg, 50 μg/kg, 100 μg/kg, 用25mL60%的甲醇-PBS溶液涡旋振荡15min, 9000g离心10min, 上清经PBS稀释后待用。

[0083] 间接竞争酶联免疫检测:

[0084] 用PBS(0.01M, pH 7.4)将AFB₁人工抗原稀释至0.25 μg/mL, 100 μL/孔, 包被于酶标板, 4℃过夜, 含0.5% Tween-20(V/V)的磷酸缓冲液(PBST)洗板5次, 拍干板条, 加入3%脱脂牛奶(W/V), 300 μL/孔, 37℃封闭2h。PBST洗板3次后, 每孔加入50 μL加入本发明针对AFB₁单域重链抗体和50 μL AFB₁标准品溶液或待测样品, 水平方向轻轻混匀, 37℃温育1h。PBST洗板5次, 拍干, 加入辣根过氧化物酶标记的兔抗His Tag标签抗体, 100 μL/孔, 37℃温育1h。PBST洗板5次, 拍干, 加入100 μL/孔TMB显色液, 37℃避光显色5min。加入50 μL/孔终止液(2M H₂SO₄), 酶标仪读数。根据测定的吸光值计算样品中AFB₁的含量。

SEQUENCE LISTING

<110> 南昌大学

<120> 一种能特异性结合黄曲霉毒素的纳米抗体

<130> 2015

<160> 21

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

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

<210> 2

<211> 375

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

caggtgcagc tcgtggagta ggggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtacag cctctggaag catctatagc ctcgttgcca tgggctggta ccgccaggct 120
 ccaggggaagc agcgcgagtg ggtcgcagat attactcgtg ttggtaacac aaacctatgcg 180
 aactccaggg aggaccgatt caccatctcg acaggtgtcc cctggaacac ggtgattctg 240
 tctatgaaca gcctggaacc tgaggacacg gccgtctatt actgtgcagc acgtcggacg 300
 ctctcacggg tacttggcac gaagagagat gagtataact actggggcca ggggaccag 360

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

<210> 6

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

cagttgcagc tcgtggagtc cggtaggagc ttggtgcagg ttggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggacg caccggcaca atctatggca tgggctgggt ccgcgaggct 120
 ccaggggaagg agcgtgagtt tntagcaact atttggtgga ctggttggtgc tccatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tctagagaca acgccaagaa cacggtatat 240
 ctgcaaatga atagcctgaa agttgaggac acggccattt attactgtgc attagataac 300
 cgccgcagtt atgttaatta ctactcctca agtgagtatg actactgggg ccaggggacc 360
 caggtcaccg tctcctca 378

<210> 7

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg Thr Gly Thr Ile Tyr
 20 25 30
 Gly Met Gly Trp Phe Arg Glu Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Trp Trp Thr Val Gly Ala Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Leu Asp Asn Arg Arg Ser Tyr Val Asp Tyr His Ser Val Ser Glu
 100 105 110
 Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 8

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

cagggtgcagc tcgtggagtc ggggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60
 tcctgtacag cctctggacg caccggcaca atctatggca tgggctggtt ccgcgaggct 120
 ccaggggaagg agcgtgagtt tgttgcgact atttgggtga ctggttgggc ccatactat 180
 gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tctagagaca acgacaagaa cacggtgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccattt attactgtgc attagataat 300
 cgccgcagtt atgttgatta cactccgta agtgagtatg actactgggg ccaggggacc 360
 caggtcaccg tctcctca 378

<210> 9

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

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

Ala Leu Asp Asn Arg Arg Ser Tyr Val Asp Tyr His Ser Val Ser Glu
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 10

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

cagttgcagc tcgtggagtc ggggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60
 tcctgtacag cctctggacg caccggcaca atctatggca tgggctgggt ccgcgaggct 120
 ccaggggaagg agcgtgagtt tgttgcgact atttggtgga ctggttggtgc cccatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tctagagaca acgacaagaa cacggtgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccattt attactgtgc attagataat 300
 cgccgcagtt atgttgatta ccaactccgta agtgagtatg actactgggg ccaggggacc 360
 caggtcaccg tctcctca 378

<210> 11

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ala Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Gly Thr Ile Tyr
 20 25 30

Gly Met Gly Trp Phe Arg Glu Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Trp Trp Thr Phe Asp Ala Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Leu Asp Asn Arg Arg Ser Tyr Val Asp Tyr Arg Ser Val Ser Glu
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 12

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

caggtgcagc tcgtggagtc ggggggagga gcggtgcagg ctgggggctc tttgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggacg caccggcaca atctatggca tgggctggtt ccgcgaggct 120
 ccaggggaagg agcgtgagtt tgttgcgact atttggtgga cttttgatgc cccatactat 180
 gcagactccg tgaagggtcg attcaccatc tctagagaca acgacaagaa cacggtgtat 240
 ctacaaatga acaacctgag cctgaggac acggccattt attactgtgc attagataat 300
 cgccgcagtt atgttgatta ccgctccgta agtgagtatg actactgggg ccaggggacc 360
 caggtcaccg tctcctca 378

<210> 13

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 13

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

<210> 14

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

cagttgcagc tcgtggagtc ggggggaggc ttggtgcagc ctgggggctc tctcacactc 60
 tcctgtgcag cctctggacg caccttcaca acgtatggca tgggctggtt ccgcgaggct 120
 ccaggggaagg agcgtgagtt tgtagcaact atgtggtgga ctggttggctc cccatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc actagagaca gcgccaagaa cacggtgtat 240
ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc gttagatacc 300
cgccgcagtt atgttgatta ccgctcctca agtgagtatg attactgggg ccaggggacc 360
caggtcaccg tctcctca 378

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 15

cttgggtggtc ctggctgc 18

<210> 16

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工引物

<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> 16

tcgcggccca gccggccatg gccagktgc agctcgtgga gtcnggngg 49

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 17

cgagtgcggc cgcgggtct tcgctgtggt gcg 33

<210> 18

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 18

cgagtgcggc cgcttgtggt tttggtgtct tggg 34

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工引物
<400> 19
ggtacgtgct gttgaactgt tcc 23
<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工引物
<400> 20
agcggataac aatttcacac agga 24
<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工引物
<400> 21
gccccattca gatcctcttc 20

专利名称(译)	一种能特异性结合黄曲霉毒素的纳米抗体		
公开(公告)号	CN107163142A	公开(公告)日	2017-09-15
申请号	CN201710265436.7	申请日	2015-12-02
[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	涂追 许杨		
发明人	涂追 许杨		
IPC分类号	C07K16/14 C12N15/13 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/14 C07K2317/569 G01N2333/38		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，涉及单域重链抗体技术，具体为针对黄曲霉毒素的单域重链抗体，其具有SEQ ID NO.:11等所示的氨基酸序列。该抗体具有耐酸碱、耐高温以及易于生产等特性，对于黄曲霉毒素的低成本、可重复使用的免疫学检测方法有重要的实用价值。

引物名称	序列
AlpVh-LD	5'-CTGGTGGTCCTGGCTGC-3'
AlpVh-SfiI	5'-tcgcccagccggccatggccCAGKTCAGCTCGTGGAGTCNGGNGG-3'
AlpVHHR1-NotI	5'-cgagtcgcccgcGGGGTCTTCGCTGTGGTGGC-3'
AlpVHHR2-NotI	5'-cgagtcgcccgcTTGTGTTTTTGGTGTCTTGGG-3'
CH ₂ -R	5'-GGTACGTGCTGTGAACGTGTTCC-3'
M13-R	5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3'
pHEN-R	5'-GCCCAATTCAGATCCTCTTC-3'