



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103361741 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 05

(21) 申请号 201310278885. 7

G01N 33/53 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 07. 04

审查员 纪圆圆

(73) 专利权人 潍坊科技学院

地址 262700 山东省潍坊市寿光市学院路
166 号

专利权人 济南格致生物技术有限公司

(72) 发明人 董金华 董益阳

(74) 专利代理机构 山东济南齐鲁科技专利事务
所有限公司 37108

代理人 宋永丽

(51) Int. Cl.

C40B 40/02 (2006. 01)

C40B 50/06 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

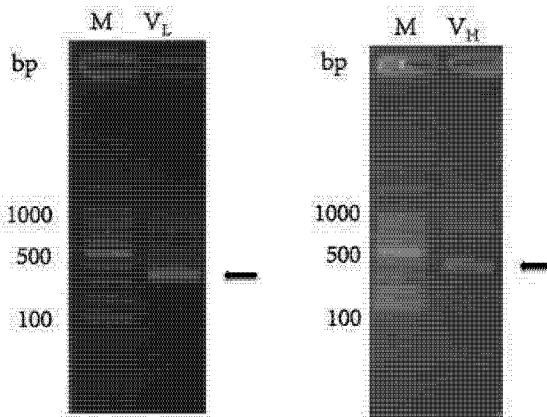
权利要求书3页 说明书8页
序列表2页 附图5页

(54) 发明名称

一种噬菌体抗体库及其在盐酸克伦特罗含量测定中的应用

(57) 摘要

本发明提供了一种噬菌体抗体库及其在盐酸克伦特罗含量测定中的应用,是通过在噬菌体质粒 pIT2 的 SalI 和 NotI 酶切位点之组装抗体轻链可变领域的基因 VL,在 SfiI 和 XhoI 酶切位点之间组装抗体重链可变领域基因 VH 构建,抗体的基因是由利用牛血清蛋白与盐酸克伦特罗偶联物免疫小鼠后得到;该抗体为单链抗体文库与牛血清蛋白与盐酸克伦特罗偶联物亲和富集,开发盐酸克伦特罗的单克隆抗体将其应用盐酸克伦特罗残留量的检测。本发明利用该抗体库可直接取得高亲和力的抗盐酸克伦特罗及具有与盐酸克伦特罗相似结构的化学物质的抗体,在盐酸克伦特罗及具有相似结构的化学物质的抗体开发及检测方面具有广泛的应用前景。



1. 一种噬菌体抗体库,其特征在于:在 pIT2 载体的 SfiI 和 XhoI 酶切位点之间组装抗体重链的可变领域基因,在 SalI 和 NotI 酶切位点之间组装抗体轻链的可变领域基因,然后通过大肠杆菌作为增幅的宿主而制作,该抗体库中盐酸克伦特罗特异性抗体可以通过利用针对盐酸克伦特罗与牛血清蛋白偶联物的淘筛而富集,进而开发单克隆的抗盐酸克伦特罗的抗体,噬菌体抗体库的质粒的构建为:

① 利用盐酸克伦特罗和牛血清蛋白的偶联物免疫 Balb/c 小鼠后,摘取小鼠的脾脏,从脾脏中提取总 RNA,并以其为模板,以 Oligo(dT)6 为引物合成 cDNA 第一链;

②利用设计合成的抗体特异性引物经 RT-PCR 分别扩增抗体重链可变领域(VH)的基因和抗体轻链可变领域(VL)的基因;

抗体重链正向引物为:

5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTYCAGCTBCAGCAGTC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTTACCTGCAGCARTC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTRCAGCTGAAGGAGTC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAACVTCAGCARCC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGATCCAGTTGGTVCAGTC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGAAGSASTC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGSKGGTGGAGTC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGAARSTTGAGGAGTC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAKGTSVAGCTTCAGGAGTC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGAASSTGGTGAATC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGAAGCTGRTGGARTC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGARGTGAAGCTGRTGGAGTC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAAGTGCAGCTGTTGGAGAC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGARGTGAAGCTTCTCSAGTC-3'
 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCARGTTACTCTGAAAGAGT-3';

抗体重链反向引物为:

5' -ACTGCTCGAGACGGTGACCGTGGTCCC-3'
 5' -ACTGCTCGAGACTGTGAGAGTGGTGCC-3'
 5' -ACTGCTCGAGACAGTGACSCAGAGTCCC-3'
 5' -ACTGCTCGAGACGGTGACTGAGGTTCC-3';

抗体轻链正向引物为:

5' -TATTCGTCGACGGATATTGTGATGACBCAGDC-3'
 5' -TATTCGTCGACGGATRITKTGATGACCCARAC-3'
 5' -TATTCGTCGACGGAAAATGTGCTCACCCAGTC-3'
 5' -TATTCGTCGACGGAYATTGTGATGACACAGTC-3'
 5' -TATTCGTCGACGGACATCCAGATGACACAGAC-3'
 5' -TATTCGTCGACGGAYATTGTGCTSACYCARTC-3'
 5' -TATTCGTCGACGGACATCCAGATGACYCARTC-3'
 5' -TATTCGTCGACGCAAATTGTTCTCACCCAGTC-3';

抗体轻链反向引物为：

5' -TTCTCGTGCGGCCGCACGTTTKATTTCCAGCTTGG-3'

5' -TTCTCGTGCGGCCGCACGTTTTATTTCCAACCTTTG-3'

5' -TTCTCGTGCGGCCGCACGTTTCAGCTCCAGCTTGG-3'；

用于检测目标基因的插入的两个载体特异性引物 M13RV, pHENseq 为：

M13RV :5' -GGAAACAGCTATGACCATG-3'，

pHENseq :5' -CTATGCGGCCCATTC-3'；

以上引物中，S=G/C，S 代表 G 或者 C；R=A/G；Y=C/T；B=C/G；K=G/T；D=A/G/T；V=A/C/G；

③纯化 PCR 增幅产物后使用相应的限制酶处理基因并将其与 pIT2 载体连接，然后转化大肠杆菌，噬菌体抗体库中含有具有核苷酸序列的基因及氨基酸序列的抗体，在噬菌体抗体库中：增幅的抗体重链可变领域(VH)，抗体轻链可变领域(VL) 基因为以小鼠脾脏总 RNA 为模板，以抗体重链可变领域(VH)，抗体轻链可变领域(VL) 相应的引物混合物为引物，运用一步法增幅而得；抗体重链可变领域(VH)基因增幅引物含有 SfiI 和 XhoI 酶切点，抗体轻链可变领域(VL) 基因的增幅引物含有 SaII 和 NotI 酶切位点。

2. 根据权利要求 1 所述的一种噬菌体抗体库，其特征在于：通过 PCR 扩增的抗体重链可变领域(VH) 与抗体轻链可变领域(VL) 基因与 pIT2 载体的连接是指：将纯化后的轻链基因以 SaII 和 NotI 内切酶进行双酶消化后接入 pIT2 载体的相应的位点；然后将纯化后的重链基因以 SfiI 和 XhoI 内切酶进行双酶消化后连接到已经含有轻链基因的 pIT2 载体。

3. 根据权利要求 1 所述的噬菌体抗体库，其特征在于：所述的大肠杆菌的转化为：

① 0.2cm 电转杯，25 μ F，2.5kV，200 Ω 的电转条件下转化感受态大肠杆菌 TG1；

②转化产物加入 2YT 培养基后 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2h，10 倍梯度稀释将菌液涂布在加入了氨苄青霉素的琼脂板上，37 $^{\circ}$ C 过夜培养；

③次日根据琼脂板上的菌落的数量，计算该抗体库的库容为 5×10^6 ；

④利用辅助噬菌体 M13K07 感染电转化后的菌液，离心沉淀菌体，用添加了氨苄青霉素和卡那霉素的 2YT (2AKYT) 培养基重悬，30 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜，离心沉淀菌体，上清即为噬菌体表面展示的抗体文库。

4. 根据权利要求 1 所述的一种噬菌体抗体库在盐酸克伦特罗含量测定中的应用，其特征在于：

①用盐酸克伦特罗与牛血清蛋白偶联物(CLEN-BSA) 包被固相 ELISA 板后，洗涤，加封闭液，洗涤，加入噬菌体抗体库，室温孵化一个小时后，洗涤去除未结合的噬菌体抗体；加入胰蛋白酶，洗脱特异性结合的噬菌体抗体，感染增殖，用辅助噬菌体 M13K07 超感染；重复以上筛选步骤，共进行 3 轮吸附 - 洗脱 - 扩增富集筛选过程；

②将最后一轮筛选且增殖所得到的噬菌体稀释后铺于培养板上培养过夜，挑取 96 个单菌落至 96 孔细胞培养板中，振荡培养过夜；从以上培养板中的各孔中取 10 μ L 菌液至第二块板，振荡培养；加入辅助噬菌体 M13K07 超感染 30 分钟，离心后加入新鲜的 2YTAK 培养基振荡培养过夜；次日离心取上清利用 ELISA 检测，测定每个孔在 450nm 和 650nm 的吸光值，按照 A450nm-A650nm 计算每孔的吸收光值；当 P/N(Positive/Negative)值大于 2.1 时，该菌株为阳性单克隆噬菌体菌株；

③取得的噬菌体抗体单克隆对盐酸克伦特罗具有亲和性,用于检测盐酸克伦特罗的含量。

一种噬菌体抗体库及其在盐酸克伦特罗含量测定中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学,是一种噬菌体抗体库及其在盐酸克伦特罗含量测定中的应用。

背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗(Clenbuterol, CLEN)是一种 $\beta 2$ 受体激动剂,属于拟肾上腺素类药物,分子量为 313.7,它能够改善动物体内的代谢途径,促进肌肉特别是骨骼肌中蛋白质的合成,抑制脂肪的合成,从而加快生长速度,为此,许多国家用于饲料添加剂。但在进一步的研究中发现,摄入盐酸克伦特罗过量会引起巨大的不良反应,严重者发生急性中毒、甲状腺功能亢进、心律失常等症状。因此,本领域技术人员提供了液相色谱、气相色谱的检测方法,用于控制盐酸克伦特罗的用量。但是,由于这类检测方法需要昂贵的设备,很难普及,所以严格控制盐酸克伦特罗的使用量仍然是难以实现的。本领域人员为了降低检测成本,采用免疫测定法检测盐酸克伦特罗的含量。在免疫测定方法的开发中,抗体的制备是核心内容,特别是近几年来正呈现与快速发展的分子生物学技术向融合的形式。抗体开发技术经历了多克隆抗血清及单克隆抗体的开发,现在已经发展到了基因工程抗体阶段。特别是噬菌体展示技术能够将抗体与抗原的结合特性与噬菌体内部所含有的抗体的基因连接到一起,在获得抗原特异性抗体的同时,可以解析抗体的基因,因此在单克隆抗体开发方面具有很大的优势。虽然免疫测定法具有快速、特异性强及样品需要量少等优点,但已公开的几种抗体用于检测盐酸克伦特罗的准确度相对较低,使盐酸克伦特罗的用量仍较难达到准确的使用。

发明内容

[0003] 本发明的目的是,提供一种噬菌体抗体库及其在盐酸克伦特罗含量测定中的应用,它用于准确检测盐酸克伦特罗的用量。

[0004] 本发明为实现上述目的,通过以下技术方案实现:一种噬菌体抗体库,在 pIT2 载体的 SfiI 和 XhoI 酶切位点之间组装抗体重链的可变领域基因,在 SalI 和 NotI 酶切位点之间组装抗体轻链的可变领域基因,然后通过大肠杆菌作为增幅的宿主而制作,该抗体库中盐酸克伦特罗特异性抗体可以通过利用针对盐酸克伦特罗与牛血清偶联物的淘筛而富集,进而开发单克隆的抗盐酸克伦特罗的抗体,噬菌体抗体库的质粒的构建为:

[0005] ① 利用盐酸克伦特罗和牛血清蛋白的偶联物免疫 Balb/c 小鼠后,摘取小鼠的脾脏,从脾脏中提取总 RNA,并以其为模板,以 Oligo(dT)6 为引物合成 cDNA 第一链;

[0006] ② 利用设计合成的抗体基因特异性引物经 RT-PCR 分别扩增抗体重链可变领域(VH)的基因和抗体轻链可变领域(VL)的基因;

[0007] ③ 纯化 PCR 增幅产物后使用相应的限制酶处理基因并将其与 pIT2 载体连接,然后转化大肠杆菌,噬菌体抗体库中含有具有以下核苷酸序列的基因及氨基酸序列的抗体:

[0008] 抗体重链可变领域(VH)的核苷酸和氨基酸序列,SEQ ID No. 1 为:

[0009]

```

1   GAGGTGAACCTGGTGGAAATCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC   60
   GluValAsnLeuValGluSerGlyGlyGlyLeuValLysProGlyGlySerLeuLysLeu

61  TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTGCCAGACT   120
   SerCysAlaAlaSerGlyPheThrPheSerSerTyrAlaMetSerTrpValArgGlnThr

121 CCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGGCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACACCTTCTAT   180
   ProGluLysArgLeuGluTrpValAlaThrIleSerSerGlyGlySerTyrThrPheTyr

181 CCACACAGTGTGAAGGGGGGATTCCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTAC   240
   ProAspSerValLysGlyArgPheThrIleSerArgAspAsnAlaLysAsnThrLeuTyr

241 CTGCAAATGAGCACTCTGAGGCTCGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGCGATGAT   300
   LeuGlnMetSerSerLeuArgSerGluAspThrAlaMetTyrTyrCysAlaSerAspAsp

301 TACAAGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACCTCTCACAGTC   348
   TyrLysAspTyrPheAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThrLeuThrVal

```

[0010] 抗体轻链可变领域(VL)的核苷酸和氨基酸序列, SEQ ID No. 2 为:

[0011]

```

1   GAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAGGTCACC   60
   GluAsnValLeuThrGlnSerProAlaIleMetSerAlaSerProGlyGluLysValThr

61  ATGACCTGCCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAAAC   120
   MetThrCysSerAlaSerSerSerValSerTyrMetHisTrpTyrGlnGlnLysSerAsn

121 ACCTCCCCCAAACCTCTGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTCGC   180
   ThrSerProLysLeuTrpIleTyrAspThrSerLysLeuAlaSerGlyValProGlyArg

181 TTCAGTGCAGCACTGGCTCTGAAACTCTTACTCTCTCAGCATCAGCAGCATGGAGGCTGAA   240
   PheSerGlySerGlySerGlyAsnSerTyrSerLeuThrIleSerSerMetGluAlaGlu

241 GATGTTGCCACTTATTACTGTTTTCAGGGGAGTGGGTACCCATTACGTTCCGGCTCGGGG   300
   AspValAlaThrTyrTyrCysPheGlnGlySerGlyTyrProPheThrPheGlySerGly

301 ACAAAAGTTGGAAATAAAAACGTCGG   324
   ThrLysLeuGluIleLysArgAla

```

[0012] 在噬菌体抗体库中:增幅的抗体重链可变领域(VH),抗体轻链可变领域(VL)基因以小鼠脾脏总 RNA 为模板,以抗体重链可变领域(VH),抗体轻链可变领域(VL)相应的引物混合物为引物,运用一步法增幅而得;抗体重链可变领域(VH)基因增幅引物含有 SfiI 和 XhoI 酶切点,抗体轻链可变领域(VL)基因的增幅引物含有 SalI 和 NotI 酶切位点。

[0013] 所述的一种噬菌体抗体库,通过 PCR 扩增的抗体重链可变领域(VH)与抗体轻链可变领域(VL)基因与 pIT2 载体的连接是指:将纯化后的轻链基因以 SalI 和 NotI 内切酶进行双酶消化后接入 pIT2 载体的相应的位点;然后将纯化后的重链基因以 SfiI 和 XhoI 内切酶进行双酶消化后连接到已经含有轻链基因的 pIT2 载体。

[0014] 所述的噬菌体抗体库,抗体中一株抗体的重链可变领域(VH)的基因的核苷酸和

其编码氨基酸序列为:SEQ ID No. 1, 抗体轻链可变领域(VL)的基因的核苷酸和其编码氨基酸序列为:SEQ ID No. 2。

[0015] 所述的噬菌体抗体库,所述的大肠杆菌的转化为:

[0016] ① 0.2cm 电转杯,25 μ F,2.5kV,200 Ω 的电转条件下转化感受态大肠杆菌 TG1;

[0017] ②转化产物加入 2YT 培养基后 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2h,10 倍梯度稀释将菌液涂布在加入了氨苄青霉素的琼脂板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养;

[0018] ③次日根据琼脂板上的菌落的数量,计算该抗体库的库容为 5×10^6 ;

[0019] ④利用辅助噬菌体 M13K07 感染电转化后的菌液,离心沉淀菌体,用添加了氨苄青霉素和卡纳霉素的 2YT (2AKYT) 培养基重悬,30 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,离心沉淀菌体,上清即为噬菌体表面展示的抗体文库。

[0020] 所述的一种噬菌体抗体库在盐酸克伦特罗含量测定中的应用:

[0021] ①用盐酸克伦特罗与牛血清蛋白偶联物(CLEN-BSA) 包被固相筛选 ELISA 板后,洗涤,加封闭液,洗涤,加入噬菌体抗体库,室温孵化一个小时后,洗涤去除未结合的噬菌体抗体;加入胰蛋白酶,洗脱特异性结合的噬菌体抗体,感染增殖,用辅助噬菌体 M13K07 超感染;重复以上筛选步骤,共进行 3 轮吸附-洗脱-扩增富集筛选过程。

[0022] ②将最后一轮筛选且增殖所得到的噬菌体稀释后铺于培养板上培养过夜,挑取 96 个单菌落至 96 孔细胞培养板中,振荡培养过夜;从以上培养板中的各孔中取 10 μ L 菌液至第二块板,振荡培养;加入辅助噬菌体 M13K07 超感染 30 分钟,离心后加入新鲜的 2YTAK 培养基振荡培养过夜。次日离心取上清利用 ELISA 检测,测定每个孔在 450nm 和 650nm 的吸光值,按照 A450nm-A650nm 计算每孔的吸收光值。当 P/N (Positive/Negative) 值大于 2.1 时,该菌株为阳性单克隆噬菌体菌株。

[0023] ③取得的噬菌体抗体单克隆对盐酸克伦特罗具有亲和性,用于检测盐酸克伦特罗的含量。

[0024] 利用本噬菌体抗体文库开发的抗体,及利用该抗体开发的盐酸克伦特罗及具有与其相似结构的化学物质的免疫检测方法。

[0025] 从天然的或者免疫后的小鼠脾细胞提取抗体基因,以改建的噬菌体载体构建噬菌体抗体库,与 ELISA 法相结合,从构建的噬菌体抗体库中筛选具有针对小分子半抗原的特异性抗体在抗体开发及小分子物质的检测方法开发方面具有很大的应用价值。本发明是关于盐酸克伦特罗的噬菌免疫抗体库的构建,本发明利用噬菌体抗体库筛选到了一株抗盐酸克伦特罗抗体,利用该抗体能够准确的检测出盐酸克伦特罗的含量。

[0026] 本发明提供的一种噬菌体抗体库用于检测盐酸克伦特罗含量,具有检测速度快、灵敏度高、准确度高、易于实施,检测成本低等优点。

附图说明

[0027] 图 1 是扩增的抗体轻链可变领域 VL 和抗体重链可变领域的基因;

[0028] 图 2 是噬菌体抗体库基因结构图;

[0029] 图 3 是针对 BSA 偶联克伦特罗淘筛结果;

[0030] 图 4 是单克隆抗体的筛选;

[0031] 图 5 是利用 A2 克隆竞争法检测克伦特罗的含量的标准曲线。

具体实施方式

[0032] 本发明的一种噬菌体抗体库,该抗体库是在 pIT2 载体的 SfiI 和 XhoI 酶切位点之间组装抗体重链的可变领域基因,在 SalI 和 NotI 酶切位点之间组装抗体轻链的可变领域基因后,通过大肠杆菌扩增噬菌体构建,噬菌体表面的单链抗体文库,并且可以与盐酸克伦特罗及具有与盐酸克伦特罗相似结构的化学物质亲和富集,开发盐酸克伦特罗及具有与其相似结构的化学物质的单克隆抗体片段,及盐酸克伦特罗及具有与其相似结构的化学物质的免疫测定方法。pIT2 是一种将抗体到噬菌体表面的质粒。还可以标记为“pIT2 质粒、pIT2 DNA 载体”。

[0033] 抗体库的载体是这样构建的:

[0034] (1) 利用盐酸克伦特罗 (CLEN) 和牛血清蛋白质 (BSA) 的偶联物 (CLEN-BSA) 免疫 Balb/c 小鼠后,提取小鼠脾脏细胞总 RNA,并以其为模板,以 Oligo (dT) 6 为引物合成 cDNA 第一链;

[0035] (2) 利用设计合成的抗体可变领域特异性基因经 RT-PCR 法分别扩增抗体重链可变领域的基因 VH 和轻链可变领域基因 VL;

[0036] (3) 将用特定的限制酶处理的轻链可变领域 (VL) 基因和抗体重链可变领域的基因 (VH) 基因克隆至 pIT2 质粒,转化大肠杆菌,构建抗体库。

[0037] 抗体中一株抗体的重链可变领域的基因 (VH) 的核苷酸和其编码氨基酸序列为: SEQ ID No. 1, 抗体轻链可变领域的基因 (VL) 的核苷酸和其编码氨基酸序列为: SEQ ID No. 2。

[0038] 所述的一种噬菌体抗体库,通过 PCR 扩增的抗体重链可变领域 (VH) 与抗体轻链可变领域 (VL) 基因与 pIT2 载体的连接是指:将纯化后的轻链基因以 SalI 和 NotI 内切酶进行双酶消化后连接入 pIT2 载体的相应的位点;然后将纯化后的重链基因以 SfiI 和 XhoI 内切酶进行双酶消化后连接到已经含有轻链基因的 pIT2 载体;因为根据重链和轻链可变领域的序列,一般认为重链的作用大于轻链,因此先连接轻链基因,后连接重链基因的作业顺序可以有效地增多抗体库的多样性,同时减少重链变异对抗体功能的影响。

[0039] 所述的大肠杆菌的转化为:(1) 0.2cm 电转杯,25 μ F,2.5kV,200 Ω 的电转条件下转化感受态大肠杆菌 TG1;(2) 转化产物加入 2YT 培养基后 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2h,10 倍梯度稀释将菌液涂布在加入了氨苄青霉素的琼脂板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养;(3) 次日根据琼脂板上的菌落的数量,计算该抗体库的库容为 5×10^6 ;(4) 利用辅助噬菌体 M13K07 感染电转化后的菌液,离心沉淀菌体,用添加了氨苄青霉素和卡纳霉素的 2YT (2AKYT) 培养基重悬,30 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,离心沉淀菌体,上清即为噬菌体表面展示的抗体文库。2YT 培养基,与 LB 培养基 (LB 肉汤) 相比,其酵母 (Yeast) 及胰蛋白胨 (Tryptone) 的含量是 LB 培养基的两倍。其配方为:1 升水中加入,16g Bacto Tryptone (细菌用胰蛋白胨),10g Bacto Yeast Extract (酵母提取物),及 5g NaCl。

[0040] 所述噬菌体抗体库在盐酸克伦特罗检测用的应用:

[0041] (1) 用牛血清蛋白与盐酸克伦特罗偶联物 (CLEN-BSA) 包被用于筛选用的 ELISA 板,加入封闭液进行封闭后,洗涤,加入噬菌体抗体库,洗涤去除未结合的噬菌体抗体,加入胰蛋白酶,洗脱与牛血清蛋白与盐酸克伦特罗偶联物 (CLEN-BSA) 特异性结合的噬菌体抗

体,感染增值,利用辅助噬菌体 M13K07 超感染后,制作用于下一轮筛选的抗体库。重复以上步骤,共进行三轮筛选,富集牛血清蛋白与盐酸克伦特罗偶联物(CLEN-BSA)特异性抗体。

[0042] (2) 执行 ELISA 评估在筛选中所得抗体库的牛血清蛋白与盐酸克伦特罗偶联物(CLEN-BSA) 结合能力,并将结合能力最强的噬菌体稀释后铺于培养板上培养过夜,挑选 96 个单菌落至细胞培养板中,振荡培养一定时间后,取部分菌液至另外一块培养板,加入辅助噬菌体 M13K07 超感染后,离心,用 2AKYT 培养基重悬沉淀,30℃振荡培养过夜。离心取上清进行 ELISA 检测,测定每孔 450nm 和 650nm 吸光值,按 A450-A650 计算每个孔吸光值,根据吸光度的大小挑选跟 CLEN-BSA 结合能力强的阳性单克隆噬菌体菌株。从该抗体库中筛选的阳性单克隆抗体可用检测溶液中盐酸克伦特罗的含量。

[0043] 本发明所述的噬菌体抗体库还包括在利用本噬菌体抗体文库开发的抗体,及利用该抗体开发的盐酸克伦特罗及具有与其相似结构的化学物质的免疫检测方法。

实施例

[0044] 1、噬菌体抗体库的构建

[0045] 材料:

[0046] 盐酸克伦特罗与牛血清蛋白偶联物(CLEN-BSA) 由杭州南开日新生物技术有限公司购得;游离盐酸克伦特罗购自中国药品生物制品检定所;总 RNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;大肠杆菌 DH5 α 购自 TaKaRa 生物技术有限公司;大肠杆菌 TG-1 购自 Amersham Bioscience(日本东京);克隆基因用的限制性内切酶,聚合酶等均购自 TaKaRa 生物公司。其他试剂若无特别说明均为国产分析纯。

[0047] 引物设计:

[0048] 为扩增抗体重链可变领域,我们设计和合成了 VH1-15 正向引物,在该引物 5' 侧附加了 SfiI/NcoI 酶切位点。

[0049] MVH1 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTTCAGCTBCAGCAGTC-3'

[0050] MVH2 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTTACCTGCAGCARTC-3'

[0051] MVH3 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTRCAGCTGAAGGAGTC-3'

[0052] MVH4 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTCCAACCTVCAGCARCC-3'

[0053] MVH5 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGATCCAGTTGGTVCAGTC-3'

[0054] MVH6 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTGCAGCTGAAGSASTC-3'

[0055] MVH7 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTGCAGSKGGTGGAGTC-3'

[0056] MVH8 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTGAARSTTGAGGAGTC-3'

[0057] MVH9 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTSVAGCTTCAGGAGTC-3'

[0058] MVH10 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTGAASSTGGTGAATC-3'

[0059] MVH11 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTGAAGCTGRTGGARTC-3'

[0060] MVH12 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTGAAGCTGRTGGAGTC-3'

[0061] MVH13 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTGCAGCTGTTGGAGAC-3'

[0062] MVH14 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTGAAGCTTCTCSAGTC-3'

[0063] MVH15 5' -TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGTTACTCTGAAAGAGT-3' ;

[0064] 扩增抗体重链可变领域的反向引物共 4 个 JH1-JH4,在该引物 5' 侧附加了 XhoI 酶

切位点。

[0065] MJH1 5' -ACTGCTCGAGACGGTGACCGTGGTCCC-3'

[0066] MJH2 5' -ACTGCTCGAGACTGTGAGAGTGGTGCC-3'

[0067] MJH3 5' -ACTGCTCGAGACAGTGACSCAGAGTCCC-3'

[0068] MJH4 5' -ACTGCTCGAGACGGTGACTGAGGTTCC-3' ;

[0069] 为扩增抗体轻链的可变领域,设计和合成了 VK1-8 正向引物,在该引物 5' 侧附加了 SalI 酶切位点。

[0070] MVK1 5' -TATTCGTCGACGGATATTGTGATGACBCAGDC-3'

[0071] MVK2 5' -TATTCGTCGACGGATRTTKTGATGACCCARAC-3'

[0072] MVK3 5' -TATTCGTCGACGGAAAATGTGCTCACCCAGTC-3'

[0073] MVK4 5' -TATTCGTCGACGGAYATTGTGATGACACAGTC-3'

[0074] MVK5 5' -TATTCGTCGACGGACATCCAGATGACACAGAC-3'

[0075] MVK6 5' -TATTCGTCGACGGAYATTGTGCTSACYCARTC-3'

[0076] MVK7 5' -TATTCGTCGACGGACATCCAGATGACYCARTC-3'

[0077] MVK8 5' -TATTCGTCGACGCAAATTGTTCTCACCCAGTC-3' ;

[0078] 扩增抗体轻链可变领域的反向引物共 3 个 JK1/2, JK4 和 JK5,在该引物 5' 侧附加了 NotI 酶切位点。

[0079] MJK1/2 5' -TTCTCGTGC GGCCGCACGTTTKATTTCCAGCTTGG-3'

[0080] MJK4 5' -TTCTCGTGC GGCCGCACGTTTTATTTCCAACCTTG-3'

[0081] MJK5 5' -TTCTCGTGC GGCCGCACGTTTCAGCTCCAGCTTGG-3' ;

[0082] 两个载体特异性引物 M13RV, pHENseq 用于检测目标基因的插入。

[0083] M13RV :5' -GGAAACAGCTATGACCATG-3'

[0084] pVLBack: 5' -CTATGCGGCCCCATTCA-3' ;

[0085] 以上引物均委托 Invitrogen 合成。

[0086] 注: A=G/C (A 代表 G 或者 C); W=A/T; M=A/C; R=A/G; Y=C/T; B=C/G; K=G/T; D=A/G/T; V=A/C/G。

[0087] 2、动物的免疫

[0088] 两只 BALB/c 小白鼠用于 CLEN-BSA 免疫。免疫隔周进行 4 次,每次用量为 100 μ g。完全弗氏佐剂用于增加免疫效果。最后一次免疫一周后,从小白鼠的尾部取血确认免疫效果。免疫成功后,提取小白鼠脾脏细胞,用于提取总 RNA。

[0089] 3、提取小鼠脾脏总 RNA,扩增抗体轻链可变领域(VL),抗体重链可变领域(VH)的基因

[0090] 按照试剂盒的说明,运用 Trizol 法提取总 RNA,并对之进行甲醛变性琼脂糖电泳分析。同时通过紫外分光光度法测定总 RNA 的纯度。抗体可变领域的基因是利用 TAKARA 公司的 PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 进行扩增。该试剂盒采用一步反应法,即首先利用 PrimeScript[®] RTase 以 RNA 为模板合成 cDNA,然后直接在反应系中利用 TaKaRa Ex Taq[®] HS 完成抗体基因的扩增。在 50 μ L 的反应系中加入 2 μ L 试剂盒中的酶混合物,25 μ L 缓冲液,1 μ g 总 RNA,及最终浓度为 0.4 μ M 的引物。反应条件为首先将混合物在 50 $^{\circ}$ C 保持 30min,然后 94 $^{\circ}$ C 保持 2min。在这个过程中完成了 cDNA 第一链的合成。然后在同样的

反应系中以 cDNA 为模板进行 VH 和 VL 基因的扩增。扩增条件为 94℃ 预变性 30sec, 55℃ 退火 30sec, 72℃ 进行延伸反应。扩增反应共进行 35 个循环后, 利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳将 PCR 扩增产物分离, 使用回收试剂盒回收扩增产物。扩增的基因片段如图 1 所示。

[0091] 4、构建用于抗体的噬菌体载体

[0092] 使用限制性内切酶 SalI 和 NotI 将回收的抗体可变领域基因 VL 消化并纯化后, 将其与用同样酶处理的 pIT2 载体连接, 连接反应使用 TOYOBO 的 Ligation High Ver.2 进行 30 分钟, 然后将连接产物转化进大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 稀释转化菌液滴定 VL 文库库容的大小, 培养剩余大肠杆菌过夜提取载体。将载体使用 SfiI/XhoI 处理后, 利用琼脂糖电泳将载体片段纯化, 并使之与 SfiI/XhoI 处理后的 VH 基因连接, 转化进大肠杆菌 TG-1, 滴定抗体文库的大小, 随机挑斑进行培养并对抗体文库进行鉴定。培养剩余菌液用于制作噬菌体抗体文库。构建的抗体库载体结构如图 2 所示。

[0093] 5、噬菌体抗体库的构建

[0094] 使用 2YTA 液态培养基(含有 100 μ g/mL 的氨苄西林的 2YT 培养基)培养转化后的大肠杆菌 TG-1 至 OD600 约为 0.6, 以 MOI=20 的比例加入辅助噬菌体 M13-K07(New England Biolabs, MA, USA), 保持菌液在 37℃ 下 30 分钟, 然后以 3000g 的速度离心 10 分钟, 去上清后加入 50 毫升的 2YTAK(含有 100 μ g/mL 的氨苄西林和 50 μ g/mL 卡那霉素的 2YT 培养基), 悬浮菌体, 摄氏 30℃ 震荡培养菌液过夜。以 6000g 的速度离心培养菌液 30 分钟后, 量取上清并加入四分之一容积的 PEG/NaCl 溶液(20% polyethylene glycol 6000, 2.5 M NaCl), 并在 4℃ 下保持 60 分钟, 在 4℃ 下以 1000g 的速度离心, 完全去上清后加入适量的高压灭菌的 PBS 溶液(KH₂PO₄, 1.47mM; Na₂HPO₄, 8.10mM; NaCl, 136.89mM; KCl, 2.68mM) 将沉淀溶解, 制得噬菌体抗体文库。经过滴定, 构建的抗体文库的库容为 5.6×10^6 CFU, 并将之用于抗体的筛选。2YTAK 为含有氨苄青霉素钠(Ampicillin) 和卡那霉素(Kanamycin) 的 2YT 培养基。

[0095] 6、筛选抗盐酸克伦特罗抗体

[0096] 6.1 富集筛选 CLEN-BSA 噬菌体抗体

[0097] 将 100 μ L 的 CLEN-BSA (10 μ g/ml) 分别加入到 3 个微孔中, 4℃ 过夜, 第二天倒掉溶液并加入 MPBS (含有 2% 脱脂牛奶的 PBS 溶液) 在室温下保持 2 小时封闭微孔。将 1.2.7 中回收的噬菌体溶液以 MPBS 稀释至 10^9 CFU/100mL (CFU: Colony Form Unit) 的浓度并在每个微孔中加 100 μ L, 室温保持 1 小时。用 PBST (含有 0.1%TWEEN20 的 PBS 溶液) 在洗板机 (BIO-RAD, 1575) 上洗板 10 次后用胰蛋白将固定在微孔板上的噬菌体溶出。溶出的噬菌体用于感染大肠杆菌并制作第二轮淘筛用抗体文库。重复以上操作 3 次, 浓缩抗体文库中的抗原特异抗体, 并用 ELISA 法来鉴定抗原特异性抗体的浓缩效果, 结果如图 3 所示。

[0098] 6.2 单克隆抗体的筛选

[0099] 在 96 孔培养用孔板内加入 200 μ L 的 2YTA 培养基, 挑取 96 个克隆并在 37℃ 下培养至 OD600 约为 0.6, 用辅助噬菌体感染菌体如 1.2.6 所述制作噬菌体。同时在 96 孔的微孔板内 4℃ 过夜固定 100 μ L 的 BSA-CLEN (1 μ g/mL), 封闭后每个孔内加入 100 μ L 的噬菌体溶液(80 μ L 的 MPBS 中加入 20 μ L 的噬菌体溶液)并在室温下保持 1 个小时。使用洗板机洗板 3 次后加入抗噬菌体抗体 Anti-M13 antibody/HRP (GE health, MA, USA), 再次在室温下保持 1 个小时, 洗板后加入底物 TMBZ 溶液(Sigma; 100 μ g/mL TMBZ and 0.04 μ L/

mL H₂O₂ in 100 mM NaOAc, pH6.0), 室温保持 5 分钟后加入 10% 的硫酸终止反应, 测定样品在 450nm 波长下的吸光度。结果如图 4 所示。

[0100] 6. 3 单克隆抗体的分析

[0101] 挑选 8 个阳性克隆 A2, A3, B1, D1, E1, G12, H5 及 H6 培养后对其序列进行了分析。重链和轻链序列解析用的引物分别为 M13RV :5-GGAAACAGCTATGACCATG-3 和 pVLBack :5-CACTGGCTGGTTTCGCTAC-3。抗体序列的分析使用了 GENETYX 软件(GENETYX CORPORATION, 日本东京)。其中 A2 单克隆抗体的重链可变领域基因的核苷酸和氨基酸序列如 SEQ ID No. 1 所示, 该抗体轻链可变领域基因的核苷酸和氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示。

[0102] 7、利用 A2 克隆竞争法测定溶液中克伦特罗的浓度

[0103] 在 96 孔的微孔板上固定 CLEN-BSA (1 μg/mL) 后进行封闭, 然后将噬菌体-抗体溶液和系列稀释的游离克伦特罗溶液 (浓度为 0, 0.016, 0.08, 0.4, 2 和 10 μg/mL) 混合后加入到微孔中, 每个浓度设置 3 个样品。室温下保持 1 小时后, 用洗板机洗板, 然后加入 HRP 修饰的抗噬菌体抗体, 继续在室温下保持 1 小时, 清洗微孔板后添加底物 TMBZ 显色, 测定在波长 450nm 下吸光度, 绘制标准曲线。结果如图 5 所示, 当溶液中游离的克伦特罗含量低时, 溶液中的 Phage-A2Fab 跟固定在微孔板上的 CLEN-BSA 结合, 洗板后在微孔中加入 HRP 修饰的抗噬菌体抗体, 该抗体跟固定在微孔板表面的 Phage-A2Fab 结合, 洗板后加入底物显色。因结合的 Phage-A2Fab 多, 其最终的信号强度也大。而随着溶液中游离克伦特罗浓度的上升, 溶液中部分 Phage-A2Fab 与游离的克伦特罗结合, 因此跟微孔板上固定的 CLEN-BSA 结合的抗体便减少, 最终信号的强度也逐渐降低。通过绘制标准曲线, 求得该曲线的半抑制率 (IC₅₀) 为 0.602 μg/mL。同时以未添加抗原的样品的吸光度减去 3 倍标准偏差计算得出该测定法能够检测出克伦特罗的最低量 (Limit Of Detection; LOD) 为 15.6ng/mL。

<110> 潍坊科技学院, 济南格致生物技术有限公司

<120> 一种噬菌体抗体库及其在盐酸克伦特罗含量测定中的应用

<160> 2

<210> 1

<211> 348

<212> DNA

<213> 鼠

<400> 1

GAGGTGAACCTGGTGAATCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC	60
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT	120
CCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACACCTTCTAT	180
CCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTAC	240
CTGCAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGCGATGAT	300
TACAAGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTC	348

1

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly	15
Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser	30
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu	45
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Phe Tyr	60
Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala	75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp	90
Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Asp Asp Tyr Lys Asp Tyr Phe	105
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val	116

<210> 2

<211> 324

<212> DNA

<213> 鼠

<400> 1

GAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAAGGTCACC	60
ATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAAAC	120
ACCTCCCCAAAACCTCTGGATTTATGACACATCCAAAACGGCTTCTGGAGTCCCAGGTCGC	180
TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAAAACCTTTACTCTCTCACGATCAGCAGCATGGAGGCTGAA	240
GATGTTGCCACTTATTACTGTTTTTCAGGGGAGTGGGTACCCATTACGTTTCGGCTCGGGG	300
ACAAAGTTGGAAATAAAAACGTGCG	324

1

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro	15
Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser	30
Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Asn Thr Ser Pro Lys Leu	45
Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg	60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser	75
Ser Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly	90
Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile	105
Lys Arg Ala	108

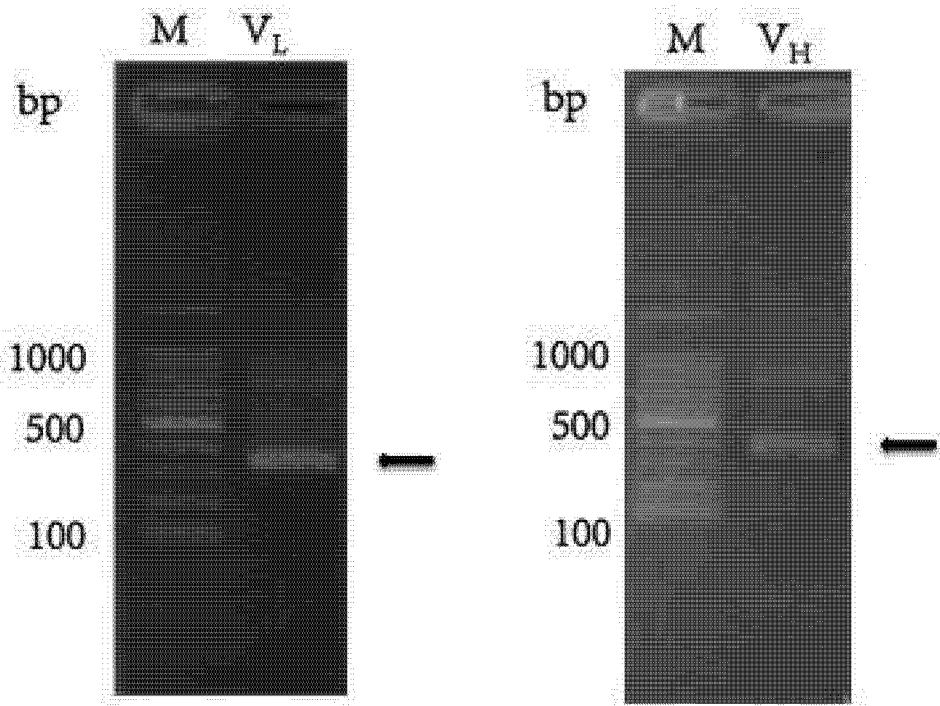


图 1

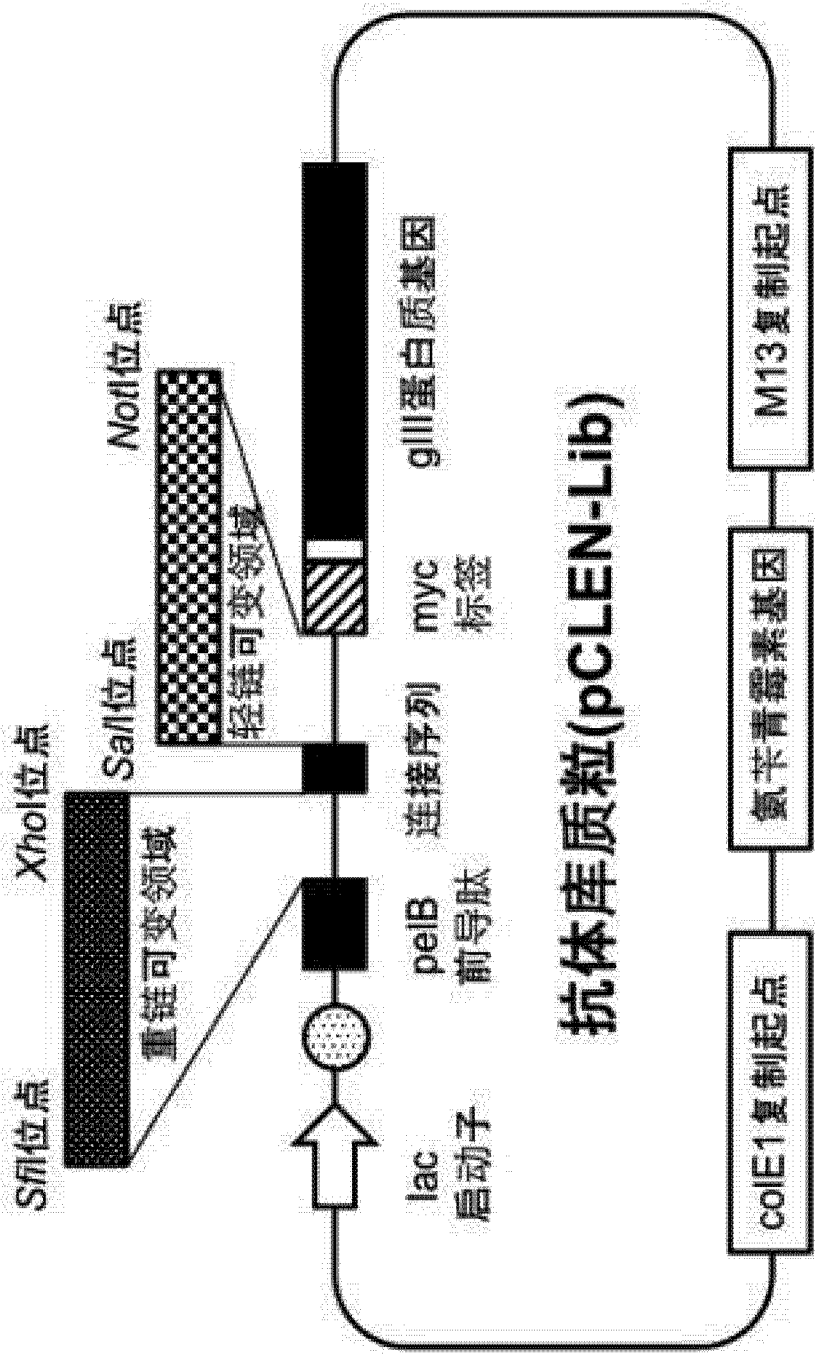
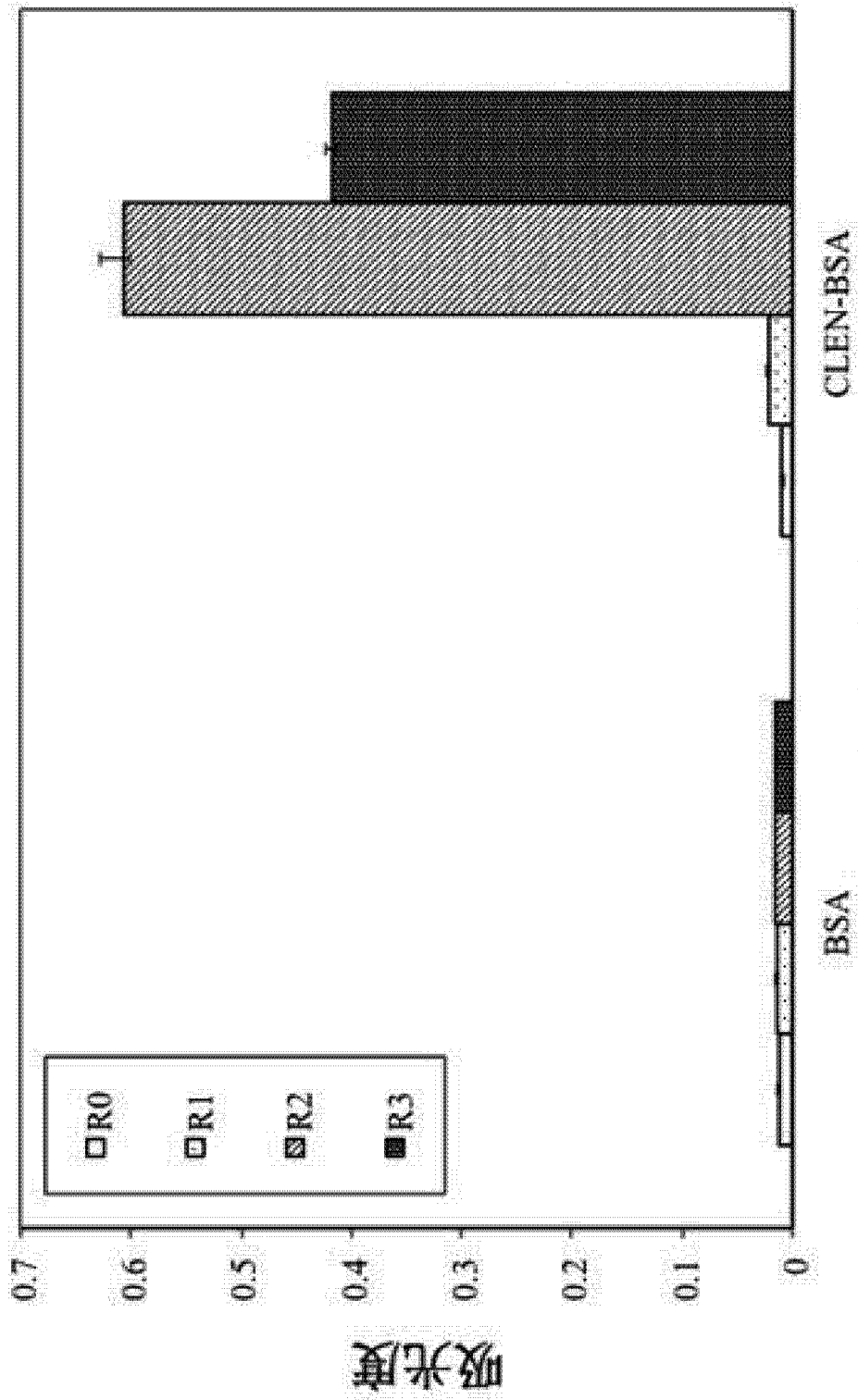


图 2



固定蛋白质

图3

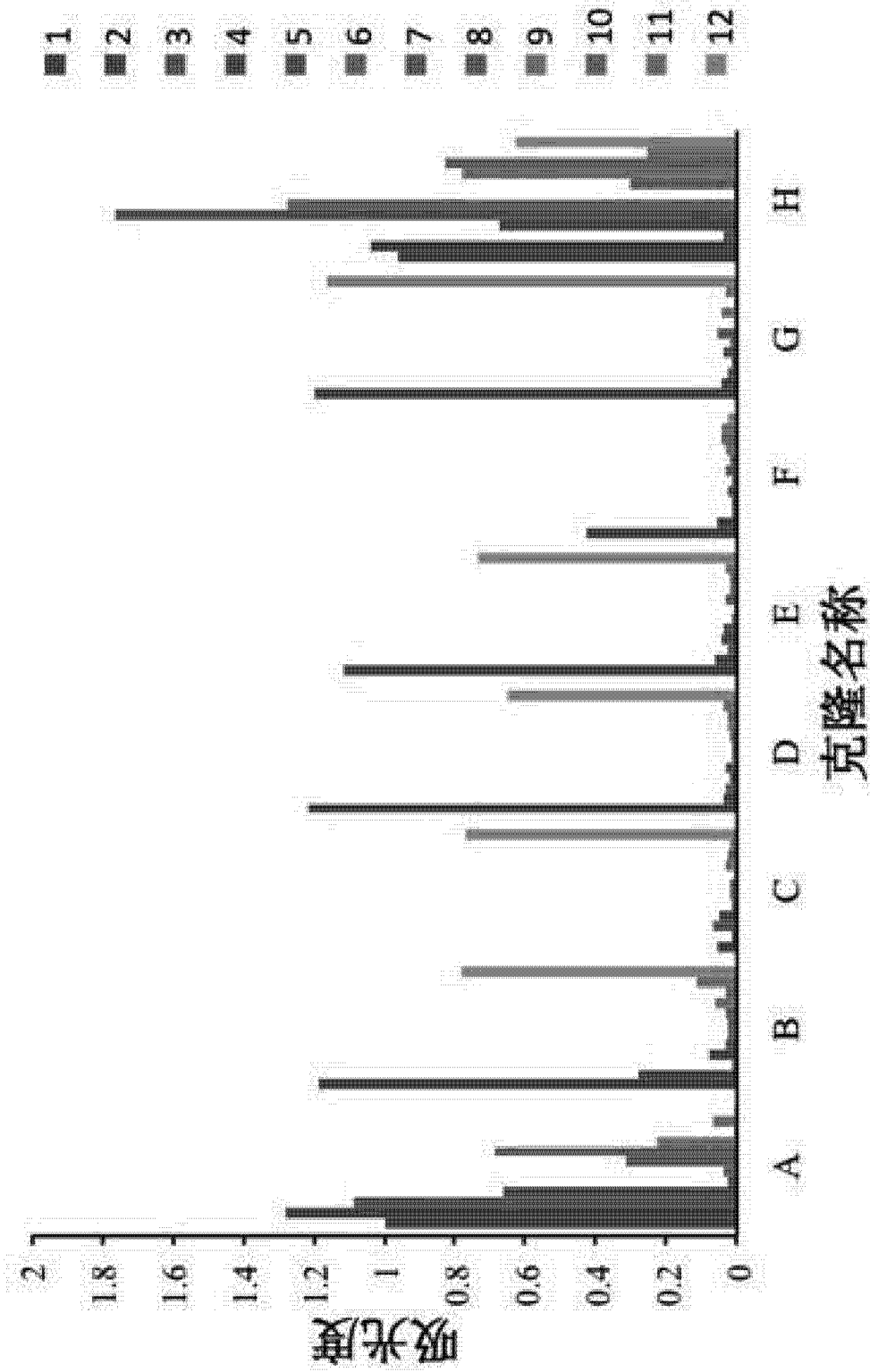


图4

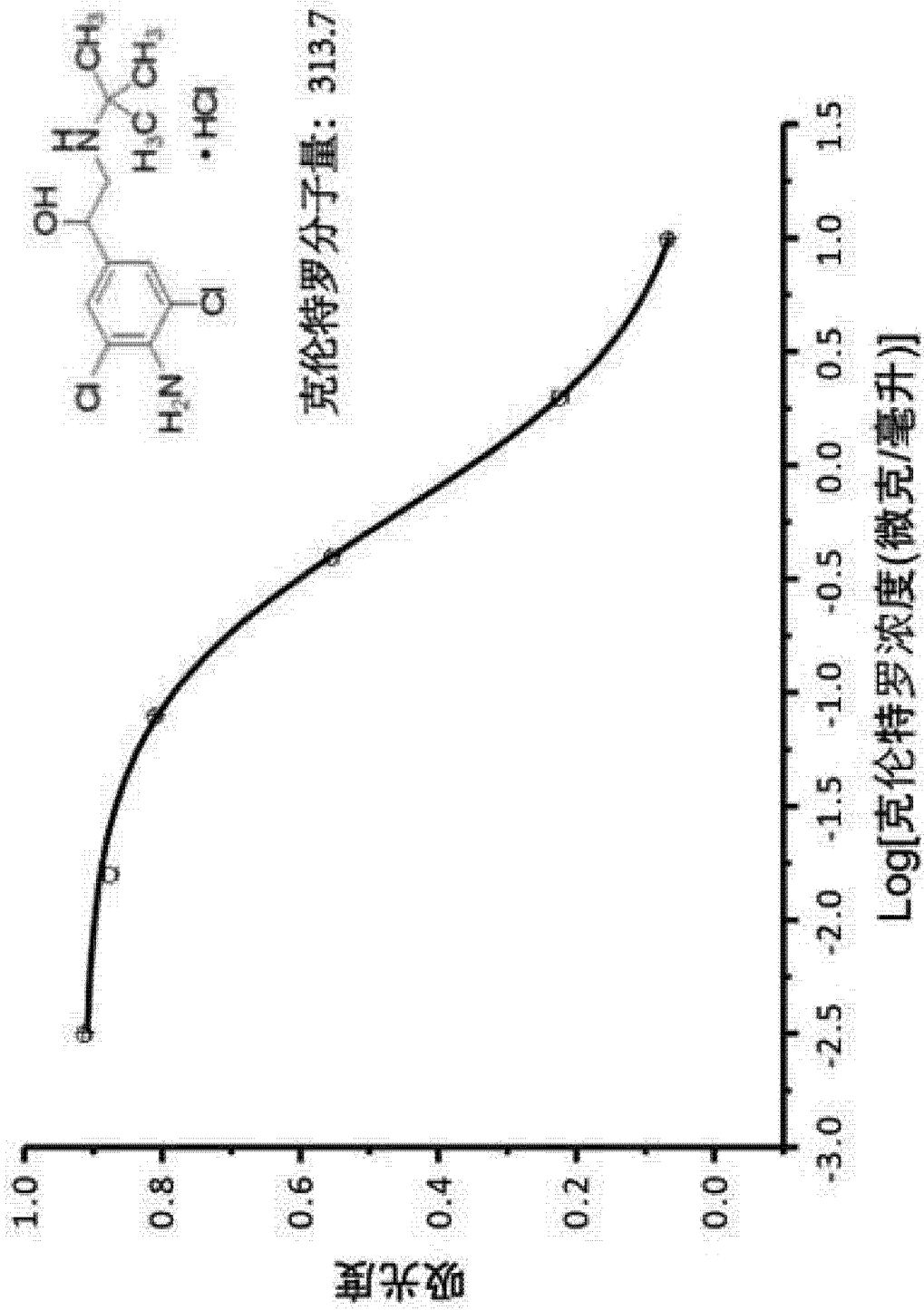


图 5

专利名称(译)	一种噬菌体抗体库及其在盐酸克伦特罗含量测定中的应用		
公开(公告)号	CN103361741B	公开(公告)日	2014-11-05
申请号	CN201310278885.7	申请日	2013-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	潍坊科技学院		
申请(专利权)人(译)	潍坊科技学院		
当前申请(专利权)人(译)	潍坊科技学院		
[标]发明人	董金华 董益阳		
发明人	董金华 董益阳		
IPC分类号	C40B40/02 C40B50/06 C12N15/13 C12N15/70 G01N33/53		
其他公开文献	CN103361741A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种噬菌体抗体库及其在盐酸克伦特罗含量测定中的应用，是通过在噬菌体质粒pIT2的Sall和NotI酶切位点之组装抗体轻链可变领域的基因VL，在SfiI和XhoI酶切位点之间组装抗体重链可变领域基因VH构建，抗体的基因是由利用牛血清蛋白与盐酸克伦特罗偶联物免疫小鼠后得到；该抗体为单链抗体文库与牛血清蛋白与盐酸克伦特罗偶联物亲和富集，开发盐酸克伦特罗的单克隆抗体将其应用盐酸克伦特罗残留量的检测。本发明利用该抗体库可直接取得高亲和力的抗盐酸克伦特罗及具有与盐酸克伦特罗相似结构的化学物质的抗体，在盐酸克伦特罗及具有相似结构的化学物质的抗体开发及检测方面具有广泛的应用前景。

