



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105907693 B

(45)授权公告日 2019.07.09

(21)申请号 201610325110.4

C07K 16/14(2006.01)

(22)申请日 2016.05.17

G01N 33/53(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/52(2006.01)

申请公布号 CN 105907693 A

C12R 1/21(2006.01)

(43)申请公布日 2016.08.31

(83)生物保藏信息

CGMCC No.12309 2016.03.28

(73)专利权人 福建农林大学

地址 350002 福建省福州市仓山区上下店路15号

(72)发明人 王荣智 汪世华 顾小松 杨航

钟燕芳 凌素美

(74)专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司

公司 35100

代理人 蔡学俊

(56)对比文件

CN 103911352 A,2014.07.09,

Ni Jin等.Preparation and

identification of monoclonal antibody

against Citreoviridin and development of

detection by Ic-ELISA.《Toxicon》.2014,第90卷226-236.

Zhen Hong Zhuang等.Artificial antigen

synthesis and the development of

polyclonal antibody-based immunoassay for

citreoviridin determination.《World J

Microbiol Biotechnol》.2013,第30卷343-349.

审查员 陈中伟

(51)Int.Cl.

C12N 1/21(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表2页 附图4页

(54)发明名称

一株表达抗黄绿青霉素的基因工程单链抗体株及其应用

(57)摘要

本发明属于抗体工程领域,具体涉及一株表达抗黄绿青霉素的基因工程单链抗体株及其应用。本发明通过琥珀酸酐法和碳二亚胺两步法合成人工完全抗原CIT-BSA和CIT-KLH,利用噬菌体展示技术,淘选出能稳定分泌表达抗黄绿青霉素CIT的基因工程单链抗体株,并通过构建原核表达载体表达纯化出具有功能的单链抗体,组装ELISA检测试剂盒,实现对农产品中残留的CIT毒素的定性定量检测,为商品化的开发生产高质量的酶联免疫检测试剂盒和金标抗体检测卡奠定了基础。

1. 一株表达抗黄绿青霉素的基因工程单链抗体株,其特征在于:所述基因工程单链抗体株为大肠艾希氏菌 (*Eschenchia coli*) TG1/scFv-5A10,已于2016年3月28日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏号为CGMCC No.12309。

2. 一种由权利要求1 所述基因工程单链抗体株产生的单链抗体,所述单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

3. 如权利要求1所述单链抗体株在农产品检测黄绿青霉素中的应用。

4. 如权利要求1所述单链抗体株在制备检测黄绿青霉素的检测试剂盒中的应用。

5. 如权利要求2所述单链抗体的应用,其特征在于,将所述的单链抗体制备成金标免疫检测试纸卡,并用于快速检测黄绿青霉素。

一株表达抗黄绿青霉素的基因工程单链抗体株及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于抗体工程领域,具体涉及一株表达抗黄绿青霉素的基因工程单链抗体株及其应用。

背景技术

[0002] 黄绿青霉素(Citreoviridin, CIT)是一种具有毒性的小分子真菌毒素,主要由黄绿青霉菌(Penicillium citreoviridin, PCV)分泌产生的,广泛的存在于谷类农作物和农副产品中,主要生长在低温高湿度等的恶劣环境中,对人和动物体的健康有害。CIT作为一种小分子毒素,具有神经毒性作用,可抑制中枢神经系统,严重的甚至会引起死亡;同时它也具有心脏血管毒性作用,很多研究表明CIT是引起心脏性脚气病主要病因;还有研究报道CIT是导致克山病的可疑原因;该毒素在体外能抑制白色念球菌生长以及艾滋病病毒HIV-1活性;许多动物实验研究表明CIT可造成大鼠肝脏和心脏的损伤,其病理改变与克山病患者的心肌病变现象相似。

[0003] 目前,针对农产品中的黄绿青霉素检测技术普遍采用的是仪器分析法,主要包括薄层色谱法(Thin-layer chromatography techniques, TLC)、高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)。此外,紫外光谱技术(UV spectrum)、红外光谱技术(IR spectrum)、荧光检测技术(Fluorescence detection, FD)、液相-质谱联用(Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)、气相-质谱联用(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)等方法也被用于黄绿青霉素的实际样品检测。但是,上述的基于色谱和光谱检测技术检测灵敏度低,特异性差,检测耗时且对样品的纯度要求高,操作复杂、需要专业的检测机构和专业技术人员,因此不适合推广和用于实际样品的快速准确的检测。免疫分析法(immuno-analysis)方法是近十多年来发展起来的新方法,是将抗原抗体反应与灵敏的检测系统结合而成的一种分析方法,具有特异性好,灵敏度高,操作技术简单,成本低,对样品的纯度要求不高等优点,特别适合于大批量样本的检测,近年来被广泛普及应用于各种毒素的检测。

[0004] 黄绿青霉素广泛存在于低温高湿地区被污染的霉变谷类作物中,它污染粮食,饲料以及食品,导致人畜患病。由于CIT在农产品中残留危害大、检测困难、不易预防,尤其是对于农产品、质检商检和卫生防疫部门来说,更需要一个简便、快速、灵敏的方法对CIT进行检测。但目前为止,基于基因工程抗体的对CIT毒素进行免疫学检测方法的研究还没见报道。因此,制备针对CIT毒素的高亲和力特异性强的基因工程抗体并建立基于基因工程抗体的免疫学检测方法,为最终开发基于基因工程抗体的商品化检测试剂盒与胶体金检测卡奠定了基础,也为CIT毒素污染的预警和监控防范奠定了基础。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一株能稳定表达高亲和力的抗CIT基因工程单链抗体株及其应用,制备针对CIT毒素的高亲和力特异性强的基因工程抗体并建立基于基因工程抗体的

免疫学检测方法,为最终开发基于基因工程抗体的商品化检测试剂盒与胶体金检测卡奠定了基础,也为CIT毒素污染的预警和监控防范奠定了基础。

[0006] 本发明首先保护一株抗CIT毒素的基因工程单链抗体株大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)TG1/scFv-5A10,已于2016年3月28日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏号为CGMCC No.12309,地址为北京朝阳区北辰西路1号院。

[0007] 其次保护一种有所述的单链抗体株TG1/5A10表达的单链抗体,所述单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,其核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0008] 所述的基因工程单链抗体的制备方法,是将噬菌体展示淘选得到的单链抗体基因扩增,克隆到原核表达载体中,并转化大肠杆菌BL21进行IPTG诱导表达纯化,获得的具有CIT抗原结合活性的单链抗体。

[0009] 本发明还保护了所述单链抗体的应用,是利用抗原抗体反应原理将产生的单链抗体用于在农产品中检测黄绿青霉素CIT。

[0010] 所述的单链抗体的应用,一是将所述的单链抗体配置在检测CIT的免疫检测试剂盒中。二是将所述的单链抗体制备成金标免疫检测试纸卡,并用于快速检测黄绿青霉素CIT。

[0011] 本发明的优点在于:本发明通过琥珀酸酐法和碳二亚胺两步法合成人工完全抗原CIT-BSA和CIT-KLH,利用噬菌体展示技术,淘选出能稳定分泌表达抗黄绿青霉素CIT的基因工程单链抗体株,并通过构建原核表达载体表达纯化出具有功能的单链抗体,组装ELISA检测试剂盒,实现对农产品中残留的CIT毒素的定性与定量检测,为商品化的开发生产高质量的酶联免疫检测试剂盒和金标抗体检测卡奠定了基础。

附图说明

[0012] 图1是本发明中淘选得到的单链抗体株的ELISA检测结果。

[0013] 图2是本发明单链抗体株PCR鉴定结果。

[0014] 图3是本发明单链抗体株DNA序列分析结果。

[0015] 图4是本发明单链抗体原核表达纯化结果。

[0016] 图5是本发明单链抗体western blot检测结果。

[0017] 图6是本发明单链抗体亲和力检测结果。

[0018] 图7是本发明单链抗体特异性检测结果。

具体实施方式

[0019] 实施例1 本发明单链抗体的制备与鉴定。

[0020] 1、黄绿青霉素人工完全抗原的制备

[0021] 本实验将黄绿青霉素(CIT)分别与载体蛋白BSA和KLH进行交联形成具有免疫原性的人工完全抗原CIT-BSA和CIT-KLH。整个交联过程分两步进行,第一步,用琥珀酸酐法将黄绿青霉素分子3位上的羟基改造成羧基;第二步,用碳二亚胺法将改造后生成的羧基与载体蛋白的氨基脱水缩合连接在一起。具体步骤如下:

[0022] (1)称取琥珀酸酐粉末60 mg溶于500 μ L无水吡啶中,同时加等物质的量的1 mol/L DMAP,65 $^{\circ}$ C烘箱中预热30~60 min,活化琥珀酸酐。

[0023] (2)将琥珀酸酐溶液直接加入1 mg的CIT固体中,使其充分溶解,然后用封口膜封口,放在65℃条件下,反应7 h(将反应进行到3 h时,再添加琥珀酸酐颗粒20 mg)。

[0024] (3)反应终止后,直接将反应产物放到4℃冰柜放置过夜。

[0025] (4)次日,将其反应物取出在室温平衡30~60 min后,对产物进行旋转蒸发干燥处理,主要是去除无水吡啶,防止其对后续反应的影响。

[0026] (5)用EDC法进行第二步反应:第一步的反应中间产物理论值是1.25 mg,将其溶解在600 μL(DMF:水=6:9)的溶液中,加入12.5 mg EDC,避光混匀30 min。

[0027] (6)再加入0.5% KLH(碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L pH 9.6)1 mL, KLH标准品5 mg,先将其在漩涡仪上振荡混匀,在12000 r/min,离心5 min),在低温摇床上25℃避光反应2 h,100 r/min;然后再补加EDC 12.5 mg,继续低温摇床上25℃避光反应4 h,结束反应。

[0028] (7)用1×PBS, pH 7.2 在4℃冰柜透析3 d,每天换液两次,将未反应完全的CIT透析掉。3 d后吸出透析液,分装-20℃保存。

[0029] CIT-BSA交联方法与上面类似,只是用0.013 mol/L NaHCO₃溶液去活化BSA标准品。

[0030] 2、基因工程单链抗体的制备。

[0031] 1)、动物免疫

[0032] 将制备的完全抗原用于免疫6只雌Balb/c小鼠,免疫取50 μg的蛋白抗原溶解在100 μL的1×PBS缓冲液中,然后与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化完全后,采用皮下多点注射法免疫小鼠,对照组用等体积PBS免疫。隔两周后,取等量的免疫原溶解在100 μL PBS缓冲液中,然后与等体积的不完全佐剂混合乳化后,采用皮下多点注射和腹腔注射相结合的方式免疫小鼠;每隔两周,进行免疫。后续的免疫步骤同于第二次免疫。免疫3~5 d后,对免疫小鼠进行尾部采血。常温下静置30 min,然后12000 r/min离心20 min,取上层橙黄色的血清,通过iELISA测抗血清效价。血清效价得到8000以上时处死小鼠,取出脾脏备用。

[0033] 2)、脾脏总RNA的提取

[0034] 免疫的小鼠获得比较满意的抗血清后,采用Trizol法进行脾脏总RNA提取。拉颈处死动物,用DEPC处理剪刀剪开小鼠腹部,迅速将脾脏取出,置于液氮预冷的研钵中加入液氮捣碎研磨成粉末。将粉末移于DEPC处理的EP管中,加入1 mL的Trizol和200 μL的氯仿,剧烈振荡混匀,10000 r/min离心5-10 min,提取上清,加入2倍体积无水乙醇或0.6倍体积的异丙醇进行RNA沉淀,离心后将沉淀吹干,加入50-100 μL的DEPC水溶解RNA。

[0035] 3)、RT-PCR与抗体基因扩增

[0036] 以提取的脾脏总RNA为模板,按照Promega试剂盒的步骤进行cDNA第一链的合成。利用抗体重链和轻链的引物分别扩增VH和VL基因,用回收的VH和VL基因,与一定量的Linker DNA基因进行PCR重组,通过重叠延伸PCR扩增scFv基因。

[0037] 4)、基因工程抗体的制备

[0038] PCR得到的产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,切割凝胶上的目的条带经Fermentas公司胶回收试剂盒进行回收目的DNA片段。将回收得到的PCR产物经*Sfi* I和*Not* I双酶切后与同样酶切的载体pCANTAB-5E DNA进行连接,二者的连接反应摩尔比例为3:1。16℃进行连接过夜。将过夜连接的DNA通过电击转化100 μL大肠杆菌TG1感受态细胞中,立即加入10 mL 2×YTG(含有2%的葡萄糖)培养基,37℃培养,待菌体生长至OD₆₀₀为0.8时,加入M13K07辅助

噬菌体,至终浓度 10^{10} pfu/mL。30 min后再加入Amp抗生素至终浓度100 μ g/mL,继续培养1 h,1000 g,4 $^{\circ}$ C离心收集菌体沉淀;向沉淀中加入新鲜的YT培养基(含有100 μ g/mL Amp和50 μ g/mL Kana),37 $^{\circ}$ C培养过夜;低温下,1000 g离心收集上清,利用PEG/NaCl沉淀噬菌体(体积比为上清:PEG/NaCl=5 :1),用新鲜的YT培养基溶解噬菌体,所得的溶液为噬菌体抗体初级库。使用不同梯度稀释的噬菌体,各取10 μ L涂布于表层琼脂糖的LB平板,计算库容量。

[0039] 5) 单链抗体的淘选

[0040] 用pH为9.6的蛋白包被液将抗原稀释成浓度为5 μ g/mL,进行96孔板包被,100 μ L/孔,于4 $^{\circ}$ C环境中包被过夜。用移液器吸走蛋白包被液,PBS洗3次,以除去游离的抗原分子,向孔中加入200 μ L/孔的PBSM封闭液,置于37 $^{\circ}$ C封闭2 h。弃去封闭液,向孔内加入已经制备好的噬菌体抗体库,100 μ L/孔,置于37 $^{\circ}$ C反应2 h。分别用PBST和PBS洗孔10次,200 μ L/孔。向反应孔中加入Gly-HCL,利用该溶液的酸性条件洗脱与TLH抗原结合的噬菌体,再用1 mol/L Tris-HCL(pH 8.0)中和Gly-HCL。立即取出上述洗脱中和的噬菌体进行TG1细胞侵染,以扩增噬菌体数目便于下一轮的淘选。照此方法进行连续6轮的富集淘选,从第三轮开始,每轮淘选得到的噬菌体各取10 μ L进行涂布。

[0041] 6) 抗原特异性单链抗体的ELISA检测

[0042] 第三、四、五、六轮的涂布的SOB-AG平板上各挑取25个单链抗体的单菌落,按照上述的方法进行噬菌体抗体的制备。用pH为9.6的蛋白包被液将抗原稀释成浓度为5 μ g/mL,进行96孔板包被,100 μ L/孔,于4 $^{\circ}$ C环境中包被过夜。用移液器吸走蛋白包被液,PBS洗3次,以除去游离的抗原分子,向孔中加入200 μ L/孔的PBSM封闭液,置于37 $^{\circ}$ C封闭2 h。弃去封闭液,向孔内分别加入上述单菌落的噬菌体抗体,100 μ L/孔,做好记录,置于37 $^{\circ}$ C反应2 h。分别用PBST和PBS洗孔10次,200 μ L/孔。加入PBSM稀释的抗pIII蛋白的单克隆抗体(1:4000稀释),置于37 $^{\circ}$ C反应2 h。重复步骤6一次,加入PBSM稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG抗体(1:8000稀释),置于37 $^{\circ}$ C反应2 h。再重复步骤6一次。每孔加入100 μ L的TMB显色缓冲液,37 $^{\circ}$ C反应15 min,加入2M H₂SO₄终止反应。OD₄₅₀ nm测定吸收值。所有实验进行3个平行,以M13K07设为阳性,而BSA设为阴性对照。经过多次ELISA检测鉴定后,选取抗原结合活性最高的单链抗体株进行后续实验分析,并对抗体株进行命名和菌种保藏使用。本实验中,通过噬菌体抗体淘选获得的具有最强抗原结合活性的单链抗体株被命名为scFv-5A10。

[0043] 7) 抗原特异性单链抗体的鉴定

[0044] 所有阳性的单链抗体株重组质粒的DNA测序均在华大基因公司进行,测序后的序列直接与NCBI数据库进行比对分析,测序时采用的引物序列为:5' -CCA TGA TTA CGC CAA GCT TTG GAG CC-3'。通过DNA测序获得scFv基因序列后,利用IMGT软件(<http://www.IMGT.org>)进行序列同源分析。通过结果分析是否该scFv具有鼠源抗体分子的结构特征,是否是一个鼠源的scFv基因以及确定其CDR特征分区。如图2所示,淘选得到的所有单链抗体株scFv-5A10在750 bp处成功扩增出一条DNA条带,以预期的大小相符合。scFv测序结果如图3所示,scFv分子由738个碱基组成,编码246个氨基酸,结构组成主要分为3部分,即VH,Linker DNA和VL。重链由372个碱基组成,编码124个氨基酸;轻链由321个碱基组成,编码107个氨基酸。NCBI序列比对发现,VH含有3个重链CDR,分别为CDR1,CDR2,CDR3;VL含有3个轻链CDR,分别为CDR1,CDR2,CDR3。CDR如图中红色表示。蓝色部分为Linker DNA。

[0045] 8) 单链抗体株TG1/scFv-5A10原核表达与Western-Blot检测

[0046] 利用EcoR I和Hind III酶切位点将scFv基因插入pET28a-mbp-linker载体中,形成重组载体pET28a-mbp-linker-scFv,将测序正确的重组质粒在大肠杆菌BL21中进行融合蛋白表达。表达的蛋白含有His6 tag标签。蛋白SDS-PAGE分析结果如图4所示:与对照菌株和空载体对照相比,在74 kDa处有一条明显的融合蛋白表达条带。SDS-PAGE分析结果表明,原核表达载体的构建是成功的,可以进行后续的相关实验。为了进一步验证可溶性抗体与抗原CIT毒素的相互作用,采用Western Blotting方法对scFv的结合能力进行验证。先将BSA-CIT抗原进行SDS-PAGE凝胶电泳,转膜后用纯化的scFv抗体孵育,经HRP标记的抗His6-tag标签的抗体反应后,采用ECL显影进行检测。Western blotting检测结果如图5所示,表达纯化的可溶性scFv能够识别CIT,在约66 kDa处有一明显的ECL显影条带。结果表明,可溶性的scFv分子对CIT抗原具有一定的结合能力。

[0047] 9) 单链抗体株TG1/scFv-5A10特异性分析与亲和力测定

[0048] 用包被缓冲液(pH 9.6)将不同的抗原(CIT-BSA、DA-BSA、AFB1-BSA、T2-BSA、Trx-CTX、OVA、BSA、KLH)稀释至1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度,洗涤封闭如同前面ELISA方式进行,以OD450 nm值分析抗体的特异性。如图6所示,该scFv抗体只特异性识别CIT抗原,而与其他相关的抗原分子不发生反应。表明该单链抗体特异性较好,与其他毒素几乎没有交叉反应。采用iELISA法测定单抗亲和常数 K_{aff} 。其具体步骤如下:将包被抗原稀释成0.25、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四个浓度包被酶标板,洗涤、封闭;将纯化的单链抗体用5% PBSM倍比稀释加入酶标板,空白孔加PBSM,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$,1~1.5 h。漂洗后加入用5% PBSM按1:8000稀释HRP标记的抗His6-tag标签的抗体,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5 h,显色终止并测定OD450 nm,根据各曲线的IC50,计算出抗体的亲和常数。如图7所示,该抗体的亲和力为 5.7×10^9 L/mol,为高亲和力抗体。

[0049] 10) 基于单链抗体的CIT模拟样品检测

[0050] 在样品提取液中按比例加入CIT毒素标准品(0、0.1、0.5、1、5、10、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),采用间接竞争ELISA法进行检测,将检测OD450 nm的值带入标准曲线,计算出每个浓度实际测得的CIT含量,进而计算其回收率及其测定的精确度。每组做3个平行重复求出批内变异系数用来表示批内误差($\text{CV}\% = (\text{SD的均值}/\text{平均批内结合率}) \times 100\%$);而批间误差则用4次测定的结合率的平均数对应的批间变异系数来表示,具体结果见表1。从表1可知,批间和批内样品的回收率测定分别为86.83%~92.28%,85.0%~95.72%,批间和批内的变异系数均小于5%。由此得出该方法的重复性好,稳定性高。

[0051] 11) 基于单链抗体的实际样品检测

[0052] 随机从市场购买不同的玉米样品,对样品进行预处理,根据本实验建立的ic-ELISA方法检测各样品的OD450值,每种样品重复6次,并根据标准曲线计算出提取液中CIT的浓度,然后再乘以稀释度以后即为样品中CIT的浓度。如表2所示,可以看出实际样品中未检测到CIT毒素。

[0053] 表1单链抗体模拟样品检测结果

投入水平 ($\mu\text{g/mL}$)	批间分析				批次分析			
		测量值	回收率	变异系数		测量值	回收率	变异系数
	n	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	(%)	n	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	(%)
[0054] 0.3	3	0.273±0.022	91.001±7.333	8.058	4	0.242±0.012	80.667±4.012	4.973
1	3	0.864±0.052	86.401±5.204	6.023	4	0.764±0.005	76.401±0.502	0.657
3	3	2.732±0.089	91.066±2.966	3.256	4	2.549±0.084	86.333±2.820	3.266
10	3	9.431±0.119	94.312±1.192	1.263	4	9.157±0.156	91.570±1.561	1.704
30	3	27.084±0.825	90.281±2.753	3.049	4	25.496±2.751	84.986±9.172	10.792
平均值			90.612±3.889	4.329			83.991±3.613	4.278

[0055] 表2 单链抗体实际样品检测结果

实际样品	OD ₄₅₀ 值	检测结果
[0056] PBS 磷酸缓冲液	1.253±0.105	-
玉米粒	1.246±0.126	-
玉米碎粉	1.252±0.056	-
玉米面	1.275±0.084	-
玉米馒头	1.322±0.112	-

[0057] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

[0039]	210	215	220
[0040]	Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr		
[0041]	225	230	235 240
[0042]	Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
[0043]		245	
[0044]	<210> 2		
[0045]	<211> 738		
[0046]	<212> DNA		
[0047]	<213> 2 <i>Ambystoma laterale</i> x <i>Ambystoma jeffersonianum</i>		
[0048]	<400> 2		
[0049]	atggcccagg tcaaactgca gcagtctggg gctgagctgg tgaggcctgg ggcttcagtg 60		
[0050]	aagctgtcct gcaaggcttc tggtacacc ttcaccagct actggataaa ctgggtgaag 120		
[0051]	cagaggcctg gacaaggcct tgagtggatc ggaaatattt atccttctga tagttatact 180		
[0052]	aactacaatc aaaagttcaa ggacaaggcc acattgactg tagacaaatc ctccagcaca 240		
[0053]	gcctacatgc agctcagcag cccgacatct gaggattctg cggctctatta ctgtccaaga 300		
[0054]	gaggggggat ggttactacg ttactatgct atgaactact ggggccaagg gaccacggtc 360		
[0055]	accgtctcct caggtggagg cggttcaggc ggaggtggct ctggcggtgg aggatcggac 420		
[0056]	attgagctca cccagtctcc agcaatcacg tctgcatctc caggggagaa ggtcaccatg 480		
[0057]	acctgcagtg ccagctcaag tataagttac atgcactggt accagcagaa gccaggcacc 540		
[0058]	tccccaaaa gatggattta tgacacatcc aaactggctt ctggagtccc tgctcgttc 600		
[0059]	agtggcagtg ggtctgggac ctcttactct ctcacaatca gcagcatgga ggctgaagat 660		
[0060]	gctgccactt attactgcca gcaaaggagt agttaccctg acacgttcgg aggggggacc 720		
[0061]	aagctggaat taaaacgg 738		
[0062]	<210> 3		
[0063]	<211> 26		
[0064]	<212> DNA		
[0065]	<213> 2 <i>Ambystoma laterale</i> x <i>Ambystoma jeffersonianum</i>		
[0066]	<400> 3		
[0067]	ccatgattac gccaaagcttt ggagcc 26		

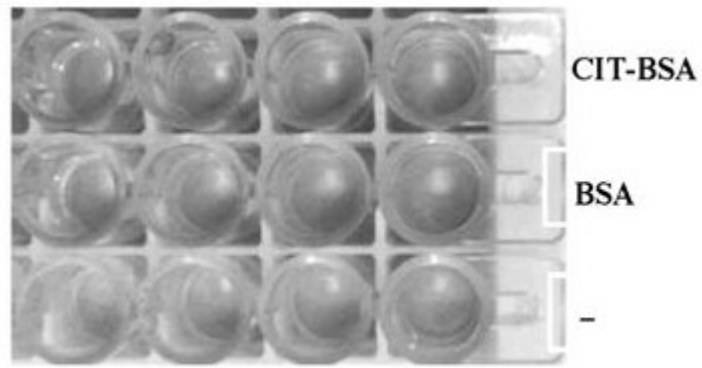


图1

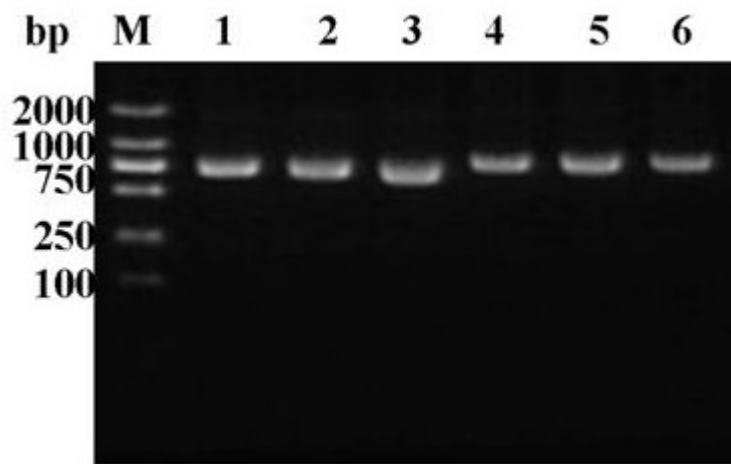


图2

ATG GCC CAG GTC AAA CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG GTG
 M A Q V K L Q Q S G A E L V
 AGG CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC
 R P G A S V K L S C K A S G Y
ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATA AAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA
 T F T ^{H-CDR1} S Y W I N W V K Q R P G
 CAA GGC CTT GAG TGG ATC GGA AAT ATT TAT CCT TCT GAT AGT TAT
 Q G L E W I G N I Y P S ^{H-CDR2} D S Y
ACT AAC TAC AAT CAA AAG TTC AAG GAC AAG GCC ACA TTG ACT GTA
 T N Y N Q K F K D K A T L T V
 GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CCG ACA
 D K S S S T A Y M Q L S S P T
 TCT GAG GAT TCT GCG GTC TAT TAC TGT CCA AGA GAG GGG GGA TGG
 S E D S A V Y Y C P R E G G W
TTA CTA CGT TAC TAT GCT ATG AAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG
 L L R Y ^{H-CDR3} Y A M N Y W G Q G T T
 GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC
 V T V S S G G G G ^{Linker} G G G G
TCT GGC GGT GGA GGA TCG GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCA
 S G G G G S D I E L T Q S P A
 ATC ACG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT
 I T S A S P G E K V T M T C S
 GCC AGC TCA AGT ATA AGT TAC ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA
 A S S ^{L-CDR1} S I S Y M H W Y Q Q K P
 GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC AAA CTG GCT
 G T S P K R W I Y ^{L-CDR2} D T S K L A
 TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT
 S G V P A R F S G S G S G T S
 TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT
 Y S L T I S S M E A E D A A T
 TAT TAC TGC CAG CAA AGG AGT AGT TAC CCG TAC ACG TTC GGA GGG
 Y Y C Q Q R S ^{L-CDR3} S Y P Y T F G G
 GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG
 G T K L E I K R

图3

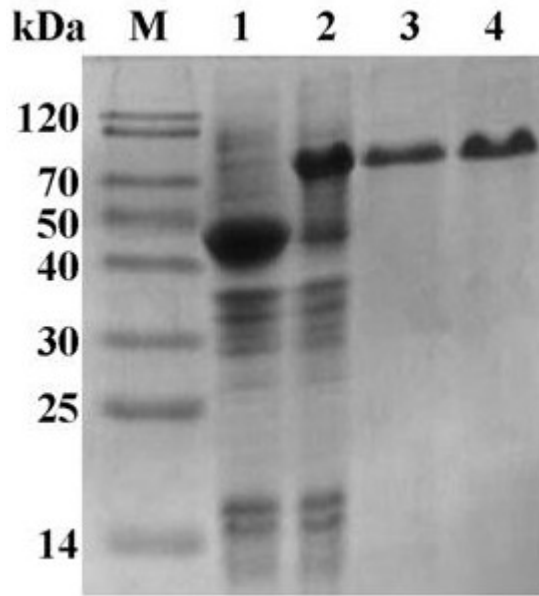


图4

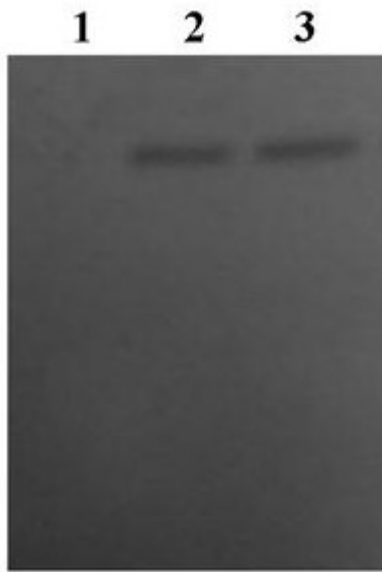


图5

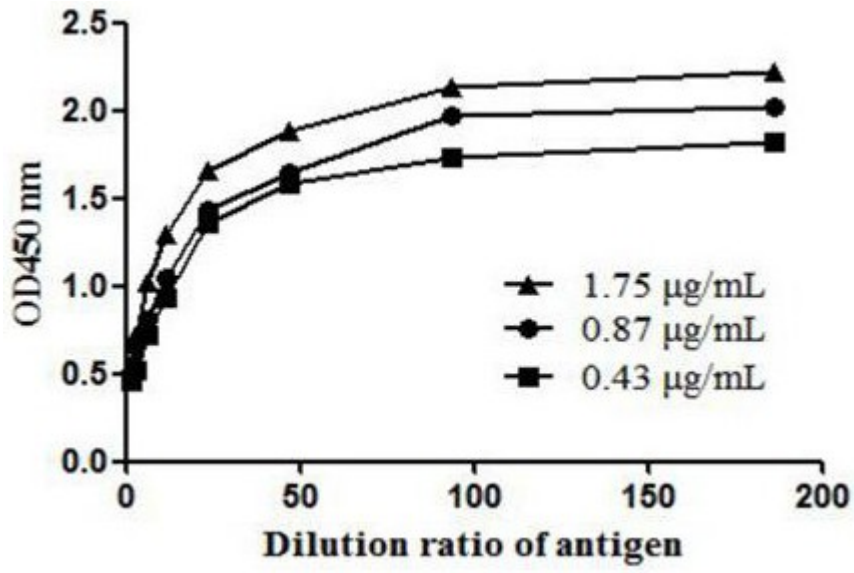


图6

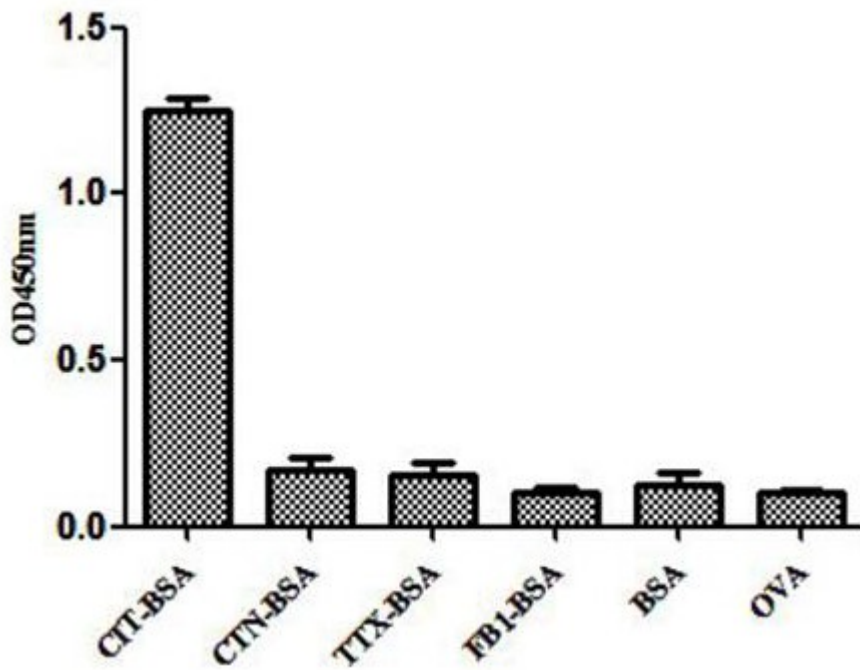


图7

专利名称(译)	一株表达抗黄绿青霉素的基因工程单链抗体株及其应用		
公开(公告)号	CN105907693B	公开(公告)日	2019-07-09
申请号	CN201610325110.4	申请日	2016-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	福建农林大学		
申请(专利权)人(译)	福建农林大学		
当前申请(专利权)人(译)	福建农林大学		
[标]发明人	王荣智 汪世华 顾小松 杨航 钟燕芳 凌素美		
发明人	王荣智 汪世华 顾小松 杨航 钟燕芳 凌素美		
IPC分类号	C12N1/21 C07K16/14 G01N33/53 G01N33/52 C12R1/21		
CPC分类号	C07K16/14 C07K2317/622 G01N33/52 G01N33/5308		
代理人(译)	蔡学俊		
审查员(译)	陈中伟		
其他公开文献	CN105907693A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于抗体工程领域，具体涉及一株表达抗黄绿青霉素的基因工程单链抗体株及其应用。本发明通过琥珀酸酐法和碳二亚胺两步法合成人工完全抗原CIT-BSA和CIT-KLH，利用噬菌体展示技术，淘选出能稳定分泌表达抗黄绿青霉素CIT的基因工程单链抗体株，并通过构建原核表达载体表达纯化出具有功能的单链抗体，组装ELISA检测试剂盒，实现对农产品中残留的CIT毒素的定性与定量检测，为商品化的开发生产高质量的酶联免疫检测试剂盒和金标抗体检测卡奠定了基础。

投入水	平	批间分析			批次分析			
		测量值	回收率	变异系数	测量值	回收率	变异系数	
($\mu\text{g/mL}$)	n	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	(%)	n	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	(%)
0.3	3	0.273 \pm 0.022	91.001 \pm 7.333	8.058	4	0.242 \pm 0.012	80.687 \pm 4.012	4.973
1	3	0.864 \pm 0.052	86.401 \pm 5.204	6.023	4	0.764 \pm 0.005	76.401 \pm 0.502	0.657
3	3	2.732 \pm 0.089	91.066 \pm 2.966	3.256	4	2.549 \pm 0.084	86.333 \pm 2.820	3.266
10	3	9.431 \pm 0.119	94.312 \pm 1.192	1.263	4	9.157 \pm 0.156	91.570 \pm 1.561	1.704
30	3	27.084 \pm 0.825	90.281 \pm 2.753	3.049	4	25.496 \pm 2.751	84.986 \pm 9.172	10.792
平均值			90.612 \pm 3.389	4.329			83.991 \pm 3.613	4.278