



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101955536 B

(45) 授权公告日 2013.03.20

(21) 申请号 201010165173.0

G01N 33/566(2006.01)

(22) 申请日 2010.05.06

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(73) 专利权人 北京维德维康生物技术有限公司
地址 100085 北京市海淀区上地开拓路5号
中关村生物医药园B区421室

(56) 对比文件

万宇平. 检测磺胺类7种药物ELISA.《试验研究》.2010,(第3期),

李研东. 单链抗体的制备及其应用.《中国饲料》.2009,(第13期),

邵建军. 天然鼠源噬菌体单链抗体库的构建.《畜牧兽医学报》.2005,第36卷(第1期),

审查员 唐慧

(72) 发明人 吴小平 王战辉 李杰超 江海洋
徐飞 温凯 王照鹏 王进
王世恩 李娜

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

C07K 16/44(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 12 页

序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种磺胺药抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种磺胺药抗体及其应用。该单链抗体由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成,所述重链可变区的氨基酸序列如序列1自N端起第1-118位氨基酸残基所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如序列1自N端起第134-248位氨基酸残基所示。本发明试剂盒和胶体金试纸卡具有灵敏度高、准确度高、精密度高、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点;能同时快速检测大批量样品,可实现现场高通量快速检测。因此,本发明的抗体、试剂盒、胶体金试纸及检测方法在磺胺药的检测中将发挥重大作用。

1. 一种单链抗体,其氨基酸序列如序列 1 所示。
2. 权利要求 1 所述单链抗体的编码基因。
3. 根据权利要求 2 所述的编码基因,其特征在于:所述编码基因的序列如序列表中序列 2 所示。
4. 含有权利要求 2 或 3 所述编码基因的重组载体。
5. 含有权利要求 2 或 3 所述编码基因的重组菌。
6. 含有权利要求 2 或 3 所述编码基因的转基因细胞系。
7. 含有权利要求 2 或 3 所述编码基因的表达盒。
8. 权利要求 1 所述单链抗体在检测磺胺药物中的应用,所述磺胺药物为如下中的至少一种:磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺甲嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺嘧啶、磺胺甲氧哒嗪和磺胺对甲氧嘧啶。
9. 一种检测磺胺药的免疫试剂盒,为下述 1)、2)、3) 或 4) 中任一所述试剂盒:
 - 1) 试剂盒中包括磺胺药半抗原与载体蛋白的偶联物、权利要求 1 所述单链抗体和酶标记抗体;其中,所述偶联物作为包被原;
 - 2) 试剂盒中包括磺胺药半抗原的酶标记物、权利要求 1 所述单链抗体和抗抗体;其中,所述抗抗体作为包被原;
 - 3) 试剂盒中包括磺胺药半抗原的酶标记物、权利要求 1 所述单链抗体;其中,权利要求 1 所述单链抗体作为包被原;
 - 4) 试剂盒中包括磺胺药半抗原与载体蛋白的偶联物、权利要求 1 所述单链抗体的酶标记物;其中,所述偶联物作为包被原。
10. 根据权利要求 9 所述的免疫试剂盒,其特征在于:

所述试剂盒中包括磺胺药标准品溶液、洗涤液和样品浓缩液;所述磺胺药标准品为磺胺二甲基嘧啶;

所述磺胺药标准品溶液为如下各浓度的溶液 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.5\mu\text{g/L}$ 、 $1.5\mu\text{g/L}$ 、 $4.5\mu\text{g/L}$ 、 $13.5\mu\text{g/L}$ 和 $40.5\mu\text{g/L}$;

每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的:将 10ml 吐温 20, 5g 叠氮化钠和 990ml 磷酸盐缓冲液混合,得到所述洗涤液;所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.005M – 0.015M , pH 值为 7.2–7.6;

所述样品浓缩液为浓度为 0.03mol/L – 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液;

磺胺药半抗原与载体蛋白的偶联物是按照如下方法制备的:(1) 将每 104mg 磺胺药半抗原与 8ml 0.25mol/L 的硫酸水溶液混合均匀,置于 4°C , 得到溶液 I;(2) 200mg 的载体蛋白与 8ml 的 Na_2CO_3 溶液混合均匀,置于 4°C , 得到溶液 II;(3) 38mg NaNO_2 与 2ml 纯水混合均匀,得到溶液 III;(4) 在 15min 内将溶液 III 加入到溶液 I 中,在此过程中,溶液 I 置于碎冰中,得到溶液 IV;(5) 将溶液 IV 加入到溶液 II 中,搅拌,得到磺胺药半抗原与载体蛋白的偶联物;

所述磺胺药半抗原为磺胺二甲基嘧啶;所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、兔血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白;

所述抗抗体为鼠抗 HIS 标签单克隆抗体。
11. 根据权利要求 10 所述的免疫试剂盒,其特征在于:每 1 升所述洗涤液是按照如下

方法配制得到的：将 10ml 吐温 20, 5g 叠氮化钠和 990ml 磷酸盐缓冲液混合，得到所述洗涤液；所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01M, pH 值为 7.4；

所述样品浓缩液为浓度为 0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液。

12. 一种检测磺胺药的胶体金试纸，包括样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和吸水垫，其依次连接；所述胶体金垫包被有胶体金标记的权利要求 1 所述单链抗体；所述反应膜上含有检测带和质控带，检测带位置包被有磺胺药半抗原与载体蛋白的偶联物，质控带位置包被有鼠抗 HIS 标签单克隆抗体；所述磺胺药半抗原为磺胺二甲基嘧啶。

13. 一种检测样品中磺胺药的方法，为如下 I) 或 II) 所示：

I) 检测样品中磺胺药的方法包括如下步骤：

1) 将待测样品进行前处理，得到待测样本溶液；

2) 用权利要求 11 所述免疫试剂盒对所述待测样本溶液进行检测；

所述前处理的方法为下述 a)、b)、c)、d) 和 e) 中的任一：

a) 所述待测样品为牛奶；将样品稀释液和所述牛奶进行混合，得到的混合溶液为待测样本溶液；所述样品稀释液和所述牛奶的体积比为 (3-5) : 1 或 4 : 1；

b) 所述待测样品为奶粉；将样品稀释液和所述奶粉进行混合，得到的混合溶液为待测样本溶液；所述样品稀释液和所述奶粉的配比为 (4-6)ml : 1g 或 5ml : 1g；

c) 所述待测样品为猪肉、蛋、鱼或虾；将每 1g 待测样品的匀浆组织与 2mL 甲醇混匀，20℃ -25℃、4000r/min 离心 10min，取上清液 1.5mL；将 1.5mL 上清液氮气吹干，用 0.5mL 样品稀释液进行复溶，得到复溶液；向复溶液中加入 1mL 正己烷混匀，20℃ -25℃、4000r/min 离心 10min，取下层水相，即为待测样本溶液；

d) 所述待测样品为鸡肉；将每 2g 待测样品的匀浆组织与 6mL 乙腈和水的混合溶液混合，15℃、3000r/min 离心 10min，取 4mL 上清液，记作上清液 I；将 4mL 上清液 I 与 2mL 氯化钠水溶液和 7mL 乙酸乙酯混匀，15℃、3000r/min 离心 10min，取出所有的上清液，记作上清液 II；将上清液 II 氮气吹干，用 1mL 样品稀释液溶解，再向其中加入 1mL 正己烷，15℃、3000r/min 离心 10min，取下层水相，即为待测样本溶液；所述乙腈和水的混合溶液中，乙腈和水的体积比为 84 : 16；所述氯化钠水溶液的浓度为 2M；

e) 所述待测样品为蜂蜜；将每 1.0g 待测样品与 1mL 1M 盐酸水溶液混匀，37℃ 孵育 30min，向其中加入 0.5mL 2M 氢氧化钠水溶液和 0.5mL 0.2M 磷酸缓冲溶液，混匀，再加入 8mL 乙腈，震荡 10min，25℃、3000r/min 离心 5min，取上层有机相 2.5mL，氮气吹干，用 0.5mL 样品稀释液溶解，得到的溶液即为待测样本溶液；

II) 检测样品中磺胺药的方法包括如下步骤：

1) 将待测样品进行前处理，得到待测样本溶液；

2) 用权利要求 12 所述胶体金试纸对所述待测样本溶液进行检测；

所述前处理的方法为：将每 1g 均质猪肉与 5mL 乙酸乙酯混匀，4℃、2000r/min 离心 5min，取 1mL 上清液，蒸发干燥，得到残留物；用 0.2mL 样品稀释液溶解所述残留物，即得到所述待测样本溶液；

所述磺胺药为如下中的至少一种：磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺甲嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺嘧啶、磺胺甲氧哒嗪和磺胺对甲氧嘧啶；

所述样品稀释液为将所述样品浓缩液稀释 20 倍得到的。

一种磺胺药抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种磺胺药抗体及其应用。

背景技术

[0002] 磺胺类药 (Sulfonamides), 是通过人工合成的氨苯磺胺衍生物, 主要用于预防和治疗细菌感染性疾病。代表药物有: 磺胺二甲基嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺甲基异恶唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹恶啉等。磺胺类药物能抑制革兰氏阳性菌及一些阴性菌, 可以治疗多种细菌感染, 在兽医临床上广泛应用于治疗由敏感细菌感染的各种畜禽疾病。

[0003] 由于磺胺类药物在体内的作用和代谢时间较长, 通过任何途径摄入的磺胺都有可能蓄积在人体内。蓄积浓度超过一定值时, 就会对人体造成损害。短时间大剂量或长时间小剂量的刺激可分别引起急性或慢性中毒, 影响机体的泌尿、免疫系统, 破坏肌肉、肾脏和甲状腺等组织, 如诱发人的甲状腺癌等。另外, 人体内长期存在磺胺会导致许多细菌对磺胺类药物产生抗药性。因此, 国际食品法典委员会 (CAC) 和许多国家规定, 食品中磺胺类总量的最大残留限量 (MRL) 为 0.1mg/kg。酶联免疫吸附分析 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, 简称 ELISA) 是将抗体抗原反应的高度特异性、敏感性与酶的高度催化性有机地结合, 在不同的载体上进行有毒物质残留分析的方法。

[0004] 目前, 用于免疫检测的抗体都是单克隆抗体或多克隆抗体。单克隆抗体或多克隆抗体的制备必须通过细胞培养获得, 整个生产过程复杂, 消耗时间长, 费用高, 且不易进行操作。单链抗体是将抗体重链可变区和轻链可变区基因通过一个短肽链连接后融合表达出来的抗体片断, 具有分子量小、特异性高、结合力强、易于利用基因工程技术操作等优点。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种检测磺胺药的单链抗体及其编码基因。

[0006] 本发明所提供的单链抗体, 由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成, 所述重链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 1-118 位氨基酸残基所示, 所述轻链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 134-248 位氨基酸残基所示。

[0007] 上述单链抗体中, 所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 119-133 位氨基酸残基所示。

[0008] 所述编码基因为如下 1)、2)、3)、4) 或 5) 所示:

[0009] 1) 所述重链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 1-354 位核苷酸所示的 DNA 分子;

[0010] 2) 所述轻链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 400-744 位核苷酸所示的 DNA 分子;

[0011] 3) 所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 355-399 位核苷酸所示的 DNA 分子;

- [0012] 4) 序列表中序列 2 所示的 DNA 分子；
- [0013] 5) 在严格条件下与 1)、2) 或 3) 或 4) 限定的 DNA 序列杂交且具有相同功能的 DNA 分子。
- [0014] 含有上述任一所述编码基因的重组载体、重组菌、转基因细胞系和表达盒也属于本发明的保护范围。
- [0015] 上述任一所述单链抗体在检测磺胺药物中的应用也属于本发明的保护范围；所述磺胺药物为如下中的至少一种：磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺甲嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺嘧啶、磺胺甲氧哒嗪和磺胺对甲氧嘧啶。
- [0016] 本发明的另一个目的是提供一种检测磺胺药的免疫试剂盒。
- [0017] 本发明所提供的检测磺胺药的免疫试剂盒，为下述 1)、2)、3) 或 4) 中任一所述试剂盒：
- [0018] 1) 试剂盒中包括磺胺药半抗原与载体蛋白的偶联物、上述任一所述单链抗体和酶标记抗体；其中，所述偶联物作为包被原；
- [0019] 2) 试剂盒中包括磺胺药半抗原的酶标记物、上述任一所述单链抗体和抗体；其中，所述抗体作为包被原；
- [0020] 3) 试剂盒中包括磺胺药半抗原的酶标记物、上述任一所述单链抗体；其中，所述单链抗体作为包被原；
- [0021] 4) 试剂盒中包括磺胺药半抗原与载体蛋白的偶联物、上述任一 2 所述单链抗体的酶标记物；其中，所述偶联物作为包被原。
- [0022] 上述任一所述免疫试剂盒中，所述试剂盒中包括磺胺药标准品溶液、洗涤液和样品浓缩液；所述磺胺药标准品为磺胺二甲基嘧啶；
- [0023] 所述磺胺药标准品溶液为如下各浓度的溶液 0 μ g/L、0.5 μ g/L、1.5 μ g/L、4.5 μ g/L、13.5 μ g/L 和 40.5 μ g/L；
- [0024] 每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的：将 10ml 吐温 20、5g 叠氮化钠和 990ml 磷酸盐缓冲液混合，得到所述洗涤液；所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.005M-0.015M，具体为 0.01M，pH 值为 7.2-7.6，具体为 7.4；
- [0025] 所述样品浓缩液为浓度为 0.03mol/L-0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液，具体为 0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液；
- [0026] 磺胺药半抗原与载体蛋白的偶联物是按照如下方法制备的：(1) 将每 104mg 磺胺药半抗原与 8mL 0.25mol/L 的硫酸水溶液混合均匀，置于 4℃，得到溶液 I；(2) 200mg 的载体蛋白与 8mL 的 Na₂CO₃ 溶液混合均匀，置于 4℃，得到溶液 II；(3) 38mgNaNO₂ 与 2mL 纯水混合均匀，得到溶液 III；(4) 在 15min 内将溶液 III 加入到溶液 I 中，在此过程中，溶液 I 置于碎冰中，得到溶液 IV；(5) 将溶液 IV 加入到溶液 II 中，搅拌，得到磺胺药半抗原与载体蛋白的偶联物；
- [0027] 所述磺胺药半抗原为磺胺二甲基嘧啶；所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、兔血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白；
- [0028] 所述抗体为鼠抗 HIS 标签单克隆抗体。
- [0029] 本发明的另一个目的是提供一种检测磺胺药的胶体金试纸。
- [0030] 本发明所提供的检测磺胺药的胶体金试纸，包括样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和

吸水垫,其依次连接;所述胶体金垫包被有胶体金标记的上述任一所述单链抗体;所述反应膜上含有检测带和质控带,检测带位置包被有上述任一所述磺胺药半抗原与载体蛋白的偶联物,质控带位置包被有鼠抗 HIS 标签单克隆抗体;所述磺胺药半抗原为磺胺二甲嘧啶。

[0031] 本发明的另一个目的是提供一种检测样品中磺胺药的方法。

[0032] 本发明所提供的检测样品中磺胺药的方法,为如下 I) 或 II) 所示:

[0033] I) 检测样品中磺胺药的方法包括如下步骤:

[0034] 1) 将待测样品进行前处理,得到待测样本溶液;

[0035] 2) 用上述任一所述免疫试剂盒对所述待测样本溶液进行检测;

[0036] 所述前处理的方法为下述 a)、b)、c)、d) 和 e) 中的任一:

[0037] a) 所述待测样品为牛奶;将样品稀释液和所述牛奶进行混合,得到的混合溶液为待测样本溶液;所述样品稀释液和所述牛奶的体积比为 (3-5) : 1 或 4 : 1;

[0038] b) 所述待测样品为奶粉;将样品稀释液和所述奶粉进行混合,得到的混合溶液为待测样本溶液;所述样品稀释液和所述奶粉的配比为 (4-6)ml : 1g 或 5ml : 1g;

[0039] c) 所述待测样品为猪肉、蛋、鱼或虾;将每 1g 待测样品的匀浆组织与 2mL 甲醇混匀,20℃ -25℃、4000r/min 离心 10min,取上清液 1.5mL;将 1.5mL 上清液氮气吹干,用 0.5mL 样品稀释液进行复溶,得到复溶液;向复溶液中加入 1mL 正己烷混匀,20℃ -25℃、4000r/min 离心 10min,取下层水相,即为待测样本溶液;

[0040] d) 所述待测样品为鸡肉;将每 2g 待测样品的匀浆组织与 6mL 乙腈和水的混合溶液混合,15℃、3000r/min 离心 10min,取 4mL 上清液,记作上清液 I;将 4mL 上清液 I 与 2mL 氯化钠水溶液和 7mL 乙酸乙酯混匀,15℃、3000r/min 离心 10min,取出所有的上清液,记作上清液 II;将上清液 II 氮气吹干,用 1mL 样品稀释液溶解,再向其中加入 1mL 正己烷,15℃、3000r/min 离心 10min,取下层水相,即为待测样本溶液;所述乙腈和水的混合溶液中,乙腈和水的体积比为 84 : 16;所述氯化钠水溶液的浓度为 2M;

[0041] e) 所述待测样品为蜂蜜;将每 1.0g 待测样品与 1mL 1M 盐酸水溶液混匀,37℃ 孵育 30min,向其中加入 0.5mL 2M 氢氧化钠水溶液和 0.5mL 0.2M 磷酸缓冲溶液,混匀,再加入 8mL 乙腈,震荡 10min,25℃、3000r/min 离心 5min,取上层有机相 2.5mL,氮气吹干,用 0.5mL 样品稀释液溶解,得到的溶液即为待测样本溶液;

[0042] II) 检测样品中磺胺药的方法包括如下步骤:

[0043] 1) 将待测样品进行前处理,得到待测样本溶液;

[0044] 2) 用上述任一所述胶体金试纸卡对所述待测样本溶液进行检测;

[0045] 所述前处理的方法为:将每 1g 均质猪肉与 5mL 乙酸乙酯混匀,4℃、2000r/min 离心 5min,取 1mL 上清液,蒸发干燥,得到残留物;用 0.2mL 样品稀释液溶解所述残留物,即得到所述待测样本溶液;

[0046] 所述磺胺药为如下中的至少一种:磺胺二甲嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺甲嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺嘧啶、磺胺甲氧哒嗪和磺胺对甲氧嘧啶;

[0047] 所述样品稀释液为将所述样品浓缩液稀释 20 倍得到的。

[0048] 上述试剂盒既可以为酶联免疫试剂盒,又可为发光免疫试剂盒,当为酶联免疫试

剂盒时,所述试剂盒中包括底物显色液;所述底物显色液由 A 液和 B 液组成,所述 A 液为浓度为 1.5% -2.5% 的过氧化脲的水溶液, B 液为浓度为 0.5% -1.5% 的四甲基联苯胺的水溶液;

[0049] 所述 A 液优选为浓度为 2% 的过氧化脲的水溶液, B 液优选为浓度为 1% 的四甲基联苯胺的水溶液。

[0050] 本发明的单链抗体 (scFv) 是用基因工程方法将抗体重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 通过一段连接肽 (Linker) 连接而成的重组抗体,是保持了亲本抗体的抗原亲和活性和特异性的最小功能性抗体片段,可通过基因工程技术体外表达得到,可在细菌中很经济地大规模生产,从而使得免疫检测抗体的生产变得非常容易、简便和经济,进而大大减少检测试剂的费用,比杂交瘤细胞培养得到单抗的方法要简单得多。本发明抗体的亲和常数为 $2.64 \times 10^9 \text{L/mol}$ 、半数抑制量 (IC_{50}) 为 1.6ng/mL。本发明为食品中磺胺药残留检测方法的建立提供高效价、高特异性的抗体来源。

[0051] 本发明试剂盒和胶体金试纸卡具有灵敏度高、准确度高、精密度高、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点;能同时快速检测大批量样品,可实现现场高通量快速检测。本发明试剂盒和胶体金试纸卡可以同时检测磺胺二甲嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺甲嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺对甲氧嘧啶多种药物,将在磺胺类药物的检测中发挥重要作用。因此,本发明的抗体、试剂盒、胶体金试纸及检测方法在磺胺药的检测中将发挥重大作用。

附图说明

[0052] 图 1 为试剂盒标准曲线。

具体实施方式

[0053] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0054] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0055] 实施例 1、抗体的制备及功能检测

[0056] 一、磺胺药单链抗体的制备

[0057] (一) 抗体的筛选

[0058] 取 6 个月雄性 Balb/c 小鼠, Trizol 一步法提取脾细胞总 RNA, 纯化得到 mRNA, 再逆转录得到 cDNA。使用 Oligo(dT) 引物, 以 cDNA 为模板分别扩增得到重链可变区 (VH)、轻链可变区 (VL) 基因, 采用重迭延伸聚合酶链式反应 (SOE-PCR) 通过一段柔性肽段 ((Gly4Ser)₃-Linker) 将 VH、VL 装配为 scFv; 将酶切 scFv 连接入核糖体展示载体 (pRDV) 中, 通过 PCR 技术在 scFv 的 5' 端引入 T7 启动子和核糖体结合位点, 3' 端引入间隔区 to1A 序列而构建出核糖体展示模板, 通过体外表达得到 mRNA-核糖体-抗体三元复合物, 构建出单链抗体核糖体展示文库, 借助 ELISA 和 PCR 技术经四轮循环筛选出特异性磺胺类药物单链抗体基因, 其中在第二轮循环时, 借助错配 PCR 和交替延伸 PCR 技术进行抗体改造, 并引入酶切位点。

[0059] 该单链抗体的编码基因序列如序列表中序列 2 所示, 自序列 2 的 5' 末端起第 1-354 位核苷酸编码重链可变区, 自序列 2 的 5' 末端起第 400-744 位核苷酸编码轻链可变

区,自序列 2 的 5' 末端起第 355-399 位核苷酸编码短肽。

[0060] 该单链抗体由重链可变区、连接所述重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区顺次连接组成。该抗体的氨基酸序列如序列表中序列 1 所示,自序列 1 的 N 端起第 1-118 位氨基酸残基为重链可变区的氨基酸序列,自序列 1 的 N 端起第 134-248 位氨基酸残基为轻链可变区的氨基酸序列,自序列 1 的 N 端起第 119-133 位氨基酸残基为短肽序列。

[0061] (二) 抗体的制备

[0062] 表达载体 pET20b 购自德国 NOVAGEN 公司;大肠杆菌 BL21 购自德国 NOVAGEN 公司;蛋白纯化用 HisLink™ Protein Purification Resin 购自美国 Promega 公司,产品目录号为 V8823。

[0063] 合成序列表中序列 2 所示基因,并在两端引入酶切位点 Xba I 和 Not I,用限制性内切酶 Xba I 和 Not I 酶切,回收目的基因片段;用限制性内切酶 XbaI 和 Not I 酶切表达载体 pET20b,回收载体大片段;连接,连接产物转化大肠杆菌,筛选培养,挑取单克隆;将单克隆接入液体培养基进一步培养,提取质粒,酶切和测序验证,结果测得的序列如序列表中序列 2 所示,表明重组载体中基因插入方向和序列均正确,将阳性重组载体记作重组表达载体 pET20b/ScFv。

[0064] 采用氯化钙法将重组表达载体 pET20b/ScFv 转化大肠杆菌 BL21,抗性筛选,经菌液 PCR 及质粒酶切验证,得到含有重组表达载体 pET20b/ScFv 的重组大肠杆菌,记作重组大肠杆菌 BL21/pET20b/ScFv。

[0065] 2×TY 培养液的组成:由胰蛋白胨、酵母提取物、NaCl 和水组成,每 1 升 2×TY 培养液中胰蛋白胨的浓度为 1.6%、酵母提取物的浓度为 1%、NaCl 的浓度为 0.5%;各百分含量均为质量百分含量。

[0066] 含氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖的 2×TY 培养液是按照如下方法得到的:向 2×TY 培养液中添加氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖,使氨苄青霉素在溶液中的终浓度为 100 μg/ml,使氯霉素在溶液中的终浓度为 34 μg/ml,使葡萄糖在溶液中的终浓度为 1% (质量百分含量)。

[0067] 发酵重组菌:将重组大肠杆菌 BL21/pET20b/ScFv 的单个阳性菌落接种至含氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖的 2×TY 培养液中,37℃ 振摇,至培养体系的 A_{600} 为 0.6 时,收集细菌;将细菌重悬于 2ml LB 液体培养基中,按 1:20 的体积比将菌悬液接种至 50ml 含相同浓度抗生素的 LB 液体培养基中(含相同浓度抗生素的 LB 液体培养基的组成:氨苄青霉素、氯霉素、酵母提取物、蛋白胨、NaCl 和水组成;溶液中各成分的浓度为:酵母提取物 0.5%,蛋白胨 1%,NaCl 1%,氨苄青霉素 100 μg/ml,氯霉素 34 μg/ml),37℃ 振摇,至培养体系的 A_{600} 为 0.6 时,加 IPTG(0.7mmol/L) 诱导,30℃ 振摇 2.5h,在 4℃ 下 5000r/min 离心 10min,收获细菌。用洗涤液(将 20mmol Tris 和 0.15mol NaCl 用水溶解,用 HCL 调 PH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升洗涤液)洗涤 1 次,加溶菌液(将 20mmol Tris、10ml Triton X-100、250 μmol PMSF、62.5×10⁴U 溶菌酶用水溶解,用 HCL 调 PH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升溶菌液),30℃ 放置 15min,然后在冰上超声处理(输出功率 80%)10s,停 10s,反复 3 次,至细胞不再粘稠。在 4℃ 2000×g 离心 20min,分别收集上清及沉淀。将沉淀用结合缓冲液 I(将 20mmol Tris、0.5mol NaCl 和 5mmol 咪唑用水溶解,用 HCL 调 PH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升结合缓冲液 I)洗涤一次,而后,悬于结合缓冲液 II(将 20mmol

Tris、0.5mol NaCl、5mmol 咪唑和 6mol 尿素用水溶解,用 HCL 调 PH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升结合缓冲液 II) 中,4℃,12000×g 离心 20min,收集上清,经 0.45mm 滤膜过滤,收集滤液,得到抗体的粗制液。

[0068] 纯化:利用表达载体上带有的组氨酸标签 (His-tag) 标记通过亲和层析纯化单链抗体蛋白。将 HisLink™ Protein Purification Resin 装柱,以 10 倍柱体积的 binding buffer (将 100mmol HEPES、10mmol 咪唑和 500mmol NaCl 用水溶解,再调节 pH 值至 7.5,然后用水定容至 1 升,得到 1 升 binding buffer) 平衡纯化柱,取抗体的粗制液上样,然后用 5 倍柱体积的 wash buffer (将 100mmol HEPES、100mmol 咪唑和用水溶解,再调节 pH 值至 7.5,然后用水定容至 1 升,得到 1 升 wash buffer) 洗脱杂蛋白,最后用 10 倍柱体积的 elution buffer (将 100mmol HEPES、250mmol 咪唑用水溶解,再调节 pH 值至 7.5,然后用水定容至 1 升,得到 1 升 elution buffer) 洗脱目标蛋白,收集洗脱液,透析,得到纯化的抗体。

[0069] 蛋白验证 Western blot:收集上述各阶段产物,进行 12% SDS-PAGE 电泳;将电泳条带印迹到 NC 膜上,再与 HRP 标记的磺胺二甲嘧啶杂交,检测发光条带。磺胺二甲嘧啶购自美国 Sigma-Aldrich 公司,产品目录号为 S6256。

[0070] 同时以转入空载体 pET20b 的大肠杆菌 BL21 作为对照,并按照上述方法进行表达和纯化,和 Western blot 检测。

[0071] Western blot 检测结果表明:1) 实验组得到的蛋白具有与磺胺二甲嘧啶结合的功能,蛋白的分子量为 29kD,与预期的蛋白分子量一致,表明目的蛋白为与磺胺二甲嘧啶的抗体。2) 对照组没有检测到任何与磺胺二甲嘧啶 (SM₂) 结合的蛋白条带。

[0072] (三) 抗体的功能检测

[0073] 1、用 ELISA 方法,检测抗体的半抑制率 (IC₅₀):

[0074] a、将实施例 2 中制备得到的偶联物 (SM₂-KLH) 用包被缓冲液溶解,得到 SM₂-KLH 的溶液 (该溶液中 SM₂-KLH 的浓度为 1 μg/ml)。包被缓冲液:pH9.6、0.1mol/L 的碳酸钠缓冲液。

[0075] 向 96 孔板的孔中加入 SM₂-KLH 的溶液,100 μL 每孔,37℃温育 2h;倾去包被液,用 PBST 溶液 (PBS+0.05% Tween20) 洗涤 3 次,250 μL 每孔,每次 30s,甩干孔中液体;

[0076] b、然后向每孔中加入 200 μL 2% BSA 封闭液,37℃温育 2h,倾去孔内液体;用 PBST 溶液 (PBS+0.05% Tween20) 洗涤 3 次,250 μL 每孔,每次 30s,甩干孔中液体。

[0077] c、向孔中加入单链抗体溶液和不同浓度的磺胺二甲嘧啶 (SM₂) 标准品溶液,各 50 μL 每孔,37℃孵育 1 小时。以只加入单链抗体溶液不加入磺胺二甲嘧啶 (SM₂) 标准品溶液的孔作阳性对照。

[0078] 单链抗体溶液的制备:用样品稀释液稀释实验(二)中的纯化抗体得到溶液,抗体在溶液中的浓度为 5ng/mL;样品稀释液为 0.002mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0079] 不同浓度的磺胺二甲嘧啶 (SM₂) 溶液的制备:用样品稀释液稀释磺胺二甲嘧啶 (SM₂) 得到溶液。

[0080] d、用 PBST 溶液 (PBS, 0.05% Tween20) 洗涤 3 次,250 μL 每孔,甩干孔中液体,加入 HRP 标记的鼠抗 His 标签单克隆抗体,37℃孵育 1 小时;

[0081] e、用 PBST 溶液 (PBS, 0.05% Tween20) 洗涤 3 次,250 μL 每孔;加入 TMB 显色,37℃反应 10 分钟,加入 2M 硫酸终止显色反应,每孔 50 μL,使用酶标仪进行读数。

[0082] 实验设 3 次重复。

[0083] 结果如下：

[0084] 1) 吸光度值与每孔所加入的标准品溶液中磺胺二甲嘧啶 (SM_2) 的浓度成反比；证明，所表达纯化得到的单链抗体具有针对磺胺二甲嘧啶 (SM_2) 的结合特异性，并呈现线性关系，说明该抗体可用于对磺胺二甲嘧啶 (SM_2) 的免疫检测。

[0085] 2) 半抑制率 (IC_{50})：阳性对照孔（即不添加磺胺二甲嘧啶 (SM_2) 标准品溶液的孔）的吸光度值为 B_0 ，各实验孔的吸光度值为 B ，当 B/B_0 为 50% 时所对应的磺胺二甲嘧啶 (SM_2) 标准品溶液的浓度即为半抑制率 (IC_{50})。该单抗的半抑制率 (IC_{50}) 为 1.6ng/mL。

[0086] 2、抗体的亲和常数测定

[0087] 方法：取定量的一定稀释度的抗体，分别加入逐渐增加的抗原里，可使抗体的结合达到饱和，以结合部分 (B) 为纵坐标，抗原浓度 (mol/L) 为横坐标绘制饱和曲线，求出抗体饱和程度为 50% 时的游离抗原浓度，其倒数即为该抗体在此稀释度下的亲和常数。

[0088] 结果：抗体的亲和常数为 $2.64 \times 10^9 L/mol$ 。

[0089] 实施例 2、检测磺胺药的酶联免疫试剂盒及其制备

[0090] 一、酶联免疫试剂盒由下述物质组成：

[0091] 1、包被磺胺二甲基嘧啶与载体蛋白偶联物的酶标板；

[0092] 2、磺胺药抗体：实施例 1 中所述单链抗体。抗体工作液的浓度为 5.0ng/mL，抗体工作液是用样品稀释液稀释实施例 1 中的纯化抗体得到的；

[0093] 3、磺胺药标准品：磺胺药标准品为磺胺二甲基嘧啶 (SM_2)，标准品溶液浓度分别为 $0 \mu g/L$ 、 $0.5 \mu g/L$ 、 $1.5 \mu g/L$ 、 $4.5 \mu g/L$ 、 $13.5 \mu g/L$ 和 $40.5 \mu g/L$ ；磺胺二甲基嘧啶购自美国 Sigma-Aldrich 公司；产品目录号为 S6256；用样品稀释液稀释成上述各浓度；

[0094] 4、酶标二抗：辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗 HIS 标签单克隆抗体；购自美国 Sigma-Aldrich 公司，产品目录号为 A7058。

[0095] 5、底物显色液：由 A 液和 B 液组成，A 液为 2% 过氧化脲的水溶液，B 液为 1% 四甲基联苯胺的水溶液；

[0096] 6、终止液：0.2M 硫酸水溶液；

[0097] 7、洗涤液：每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的：将 10ml 吐温 20、5g 叠氮化钠和 990ml 磷酸盐缓冲液混合，得到所述洗涤液；所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01M，pH 值为 7.4；

[0098] 8、样品浓缩液：0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液；将其进行 20 倍稀释，成为样品稀释液后使用。

[0099] 二、试剂盒组分的制备

[0100] (一) 包被原的制备

[0101] 用重氮化法将半抗原 SM_2 偶联于载体蛋白 KLH 上，由于 SM_2 具有芳伯氨基的半抗原，在强酸和冷却条件下芳伯氨基生成亲电重氮盐，与载体蛋白中的强给电子基团发生反应，生成重氮产物，形成包被抗原 SM_2 -KLH。

[0102] 以磺胺二甲基嘧啶 (SM_2) 作为磺胺二甲基嘧啶半抗原。

[0103] (1) 取 104mg 磺胺二甲基嘧啶 (SM_2)，加入 8mL $0.25mol L^{-1}$ 的硫酸水溶液中，置于 $4^\circ C$ 冰箱，形成溶液 I（含 SM_2 ）；

[0104] (2) 200mg 的血蓝蛋白 (KLH) 溶于 8mL 的 Na_2CO_3 溶液中 ($\text{pH} = 10$), 置于 4°C 冰箱, 形成溶液 II (含 KLH);

[0105] (3) 38mg NaNO_2 , 加入 2mL 纯水, 得到溶液 III (含 NaNO_2);

[0106] (4) 将溶液 III (含 NaNO_2) 缓慢加入到溶液 I (含 SM_2) 中, 在此过程中, 溶液 I (含 SM_2) 置于碎冰中, 大概 15min, 得到溶液 IV (含 $\text{SM}_2\text{-NaNO}_2$ 混合物);

[0107] (5) 将溶液 IV (含 $\text{SM}_2\text{-NaNO}_2$ 混合物) 缓慢加入到溶液 II (含 KLH) 中, 并摇动烧杯, 此时有红色生成; 6min 后, 将烧杯置于磁力搅拌器上, 室温慢速搅拌, 继续加溶液 IV (含 $\text{SM}_2\text{-NaNO}_2$ 混合物); 在搅拌过程中, 检测 pH 值, 使之保持在 9-10 之间, 最终溶液变成暗红色液体; 室温继续搅拌 4h; 装入透析袋, 生理盐水透析。得到磺胺二甲基嘧啶与血蓝蛋白的偶联物 ($\text{SM}_2\text{-KLH}$), 即为包被原。

[0108] 半抗原 SM_2 与载体蛋白 KLH 的偶联比为 1 : 10。

[0109] (二) 包被有包被原的酶标板及其制备

[0110] 包被有合成抗原 $\text{SM}_2\text{-KLH}$ 的聚苯乙烯酶标板: 用 10mM 的碳酸盐溶液将包被原作 1 : 50000 倍稀释 ($6.0 \mu\text{g/mL}$), 包被 96 孔聚苯乙烯酶标板, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 37°C 温育 2h, 倾去包被液, 用洗涤液稀释 20 倍后洗涤 3 次, 每次 30s, 拍干, 然后在每孔中加入 $200 \mu\text{L}$ 封闭液, 37°C 温育 2h, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

[0111] 包被缓冲液: $\text{pH} 9.6$, 0.05mol/L 的碳酸钠缓冲液;

[0112] 封闭液: 每 1 升封闭液按照如下方法配制: 将 5ml 马血清、1g 叠氮化钠、30g 酪蛋白混合, 用磷酸盐缓冲液溶解并定容至 1000ml, 得到封闭液; 其中, 磷酸盐缓冲液的浓度为 0.02M , pH 值为 7.2。

[0113] 三、试剂盒检测方法

[0114] 本实验中的样品稀释液: 将试剂盒中的浓缩液稀释 20 倍得到。

[0115] 本实验中的洗板液: 即为实验一种所述试剂盒中的洗涤液。

[0116] 1、检测样本为牛奶、奶粉: 新鲜牛奶直接用样品液稀释后进行检测, 比例按照 1 : 4, 取 $50 \mu\text{L}$ 用于检测。称取 1g 奶粉, 溶于 5mL 样品液中稀释, 混合均匀, 取 $50 \mu\text{L}$ 用于检测。

[0117] 2、检测样本为猪肉、蛋、鱼或虾: 称取 1g 匀浆组织到具塞离心管中, 加入 2mL 甲醇涡动 30s, $20\text{-}25^\circ\text{C}$ 、4000r/min 离心 10min, 取上清液 1.5mL; 将 1.5mL 上清液移到新的离心管中, 氮气吹干, 取 0.5mL 样品稀释液进行复溶, 得到复溶液; 向复溶液中加入 1mL 正己烷 (或正庚烷) 后, 涡动 10s, 进行脱脂, 4000r/min 离心 10min ($20\text{-}25^\circ\text{C}$), 取 $50 \mu\text{L}$ 下层水相, 即检测样本溶液, 用于分析。

[0118] 3、检测样本为鸡肉: 称取 2g 匀浆组织到具塞离心管中, 加入 6mL 乙腈 / 水 (84 : 16, V : V) 后, 振荡 10min, 3000r/min 离心 10min (15°C), 取 4mL 上清液, 记作上清液 I; 将 4mL 上清液 I 移到新的离心管中, 加入 2mL 氯化钠水溶液 (2M) 和 7mL 乙酸乙酯, 振荡 10min, 3000r/min 离心 10min (15°C), 取出所有的上清液, 记作上清液 II; 将所有的上清液 II 移到新的离心管中, 氮气吹干, 取 1mL 样品稀释液涡动 1min, 进行复溶, 得到复溶液; 向复溶液中加入 1mL 正己烷 (或正庚烷) 后, 涡动 2min, 3000r/min 离心 10min (15°C), 取 $50 \mu\text{L}$ 下层水相, 即检测样本溶液, 用于分析。

[0119] 4、检测样本为蜂蜜: 称取 1.0g 蜂蜜样本至 50mL 聚苯乙烯离心管中; 加入 1mL

[0120] 1M 盐酸水溶液,用振荡器振荡至蜂蜜全部溶解;放入 37℃ 培养箱中孵育 30min;取出,加入 0.5mL 2M 氢氧化钠水溶液和 0.5mL 0.2M 磷酸缓冲溶液,涡动混匀,再加入 8mL 乙腈,震荡 10min,3000r/min、室温下离心 5min;取上层有机相 2.5mL 至 10mL 干净的玻璃试管中,于 50 ~ 60℃ 水浴氮气流下吹干;加 0.5mL 样品稀释液涡动 5min 溶解;取 50mL 用于分析。

[0121] (二) 用试剂盒检测

[0122] 1、标准曲线的制作

[0123] 向包被有包被原的酶标板微孔中加入磺胺药标准品(即磺胺二甲基嘧啶 SM₂) 溶液 50 μL,再加入磺胺药抗体工作液 50 μL,用盖板膜封板,37℃ 恒温箱中反应 30min,倒出孔中液体,每孔加入 250 μL 洗涤液,30s 后倒出孔中液体,如此重复操作共洗板 5 次,用吸水纸拍干。加入酶标二抗工作液 100 μL,37℃ 恒温箱中反应 30min,倒出孔中液体,重复洗涤步骤,每孔加入底物显色液,轻轻振荡混匀,37℃ 恒温箱避光显色 15min,每孔加入终止液 50 μL,轻轻振荡混匀,用酶标仪,测定每孔吸光度值。

[0124] 用每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品溶液(0 标准)的吸光度值(B₀)再乘以 100%,得到百分吸光度值。以磺胺药标准品浓度(μg/L)的半对数值为 X 轴,百分吸光度值为 Y 轴,绘制标准曲线图。得到的标准曲线如图 1 所示。

[0125] 百分吸光度值(%) = $(B/B_0) \times 100\%$

[0126] 2、样品中磺胺药浓度的测定

[0127] 向包被有包被原的酶标板微孔中加入检测样本溶液 50 μL,再加入磺胺药单链抗体工作液 50 μL,用盖板膜封板,37℃ 恒温箱中反应 30min,倒出孔中液体,每孔加入 250 μL 洗板液,30s 后倒出孔中液体,如此重复操作共洗板 5 次,用吸水纸拍干。加入辣根过氧化物酶标记的二抗工作液 100 μL,37℃ 恒温箱中反应 30min,倒出孔中液体,重复洗涤步骤,每孔加入混合底物显色液 100 μL,轻轻振荡混匀,37℃ 恒温箱避光显色 15min,每孔加入终止液 50 μL,轻轻振荡混匀,用酶标仪,测定每孔吸光度值。

[0128] 结果判断:用每个检测样本溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品溶液(0 标准)的吸光度值(B₀)再乘以 100%,得到百分吸光度值。相对应每一个检测样本溶液的百分吸光度值,则可从标准曲线上读出检测样本溶液的吸光度值,再根据标准品溶液的浓度值换算得到样本溶液中磺胺药的残留量。

[0129] 四、试剂盒检测效果评价

[0130] (一) 准确度试验

[0131] 向不含磺胺药的样品(牛奶、鸡肉和猪肉)中添加磺胺药标准品(即磺胺二甲基嘧啶 SM₂),使磺胺药标准品在样品中的终浓度分别为 10 μg/L(μg/kg)、20 μg/L(μg/kg);将添加后的样品分别按照实验三中所述方法进行前处理,得到检测样本溶液。

[0132] 从三个不同批次的试剂盒中各抽取 3 个试剂盒进行检测,每个实验重复 5 次,分别计算变异系数。结果分别见表 1。

[0133] 表 1 磺胺二甲基嘧啶准确度的测定结果

样品	添加浓度	第一批		第二批		第三批		批间 CV%
		回收率%	CV%	回收率%	CV%	回收率%	CV%	
[0134] 鸡肉 μg/kg	10	85.2	9.1	77.5	8.5	84.3	7.4	10.3
	20	72.2	8.2	87.5	7.1	92.7	9.0	11.8
猪肉 μg/kg	10	80.7	7.2	97.5	8.3	80.2	9.9	13.0
	20	72.4	8.0	72.5	8.4	86.5	9.3	10.7
牛奶 μg/L	10	81.1	7.7	90.2	6.9	84.2	8.9	12.9
	20	83.3	6.4	86.4	8.4	87.6	9.1	11.6

[0135] 板内变异系数的计算方法：

[0136] 板内变异系数=同一次测定的同一块板内某样本（一般为中等水平）重复测定次数所得结果的变异系数。

[0137] 批内变异系数的计算方法：

[0138] 批内变异系数=同一次测定中各平行样本的变异系数。

[0139] 批间变异系数的计算方法：

[0140] 批间变异系数=同一样本在不同批次测定结果的变异系数，取其平均值。

[0141] 结果表明：所有样品的添加回收率在 72.2%~97.5%，批内变异系数在 6.4%~9.9%，批间变异系数在 10.7%~13.0%。

[0142] （二）试剂盒保存期

[0143] 试剂盒保存条件为 2-8℃，经过 12 个月的测定，试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、磺胺药添加实际测定值均在正常范围之内。考虑到运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将试剂盒在 37℃ 保存的条件下放置 8 天，进行加速老化实验，结果表明该试剂盒的各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生，将试剂盒放入 -20℃ 冰箱冷冻 8 天，测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在 2-8℃ 至少可以保存 12 个月以上。

[0144] （三）交叉反应率试验：

[0145] 选择磺胺二甲基嘧啶结构相似的其他磺胺类药物，通过各种标准曲线分别得到其 50%抑制浓度。用下式计算试剂盒对其它类似物的交叉反应率：

[0146]

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起50\%抑制的磺胺二甲基嘧啶浓度}}{\text{引起50\%抑制的类似物浓度}} \times 100\%$$

[0147] 表 1 试剂盒的特异性

	药物名称	交叉反应率 (%)
	磺胺二甲基嘧啶 (SM ₂)	100
	磺胺甲噁唑 (SMZ)	150
	磺胺甲嘧啶 (SM ₁)	200
	磺胺间二甲氧嘧啶 (SDM)	180
	磺胺间甲氧嘧啶 (SMM)	310
[0148]	磺胺喹噁啉 (SQX)	210
	磺胺嘧啶 (SD)	110
	磺胺甲氧哒嗪 (SMP)	260
	磺胺对甲氧嘧啶 (SMD)	320
	磺胺噻唑 (ST)	23
	磺胺醋酰 (SA)	15
	磺胺吡啶 (SPD)	3

[0149] 实验表明,本发明试剂盒对磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺甲嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺对甲氧嘧啶的特异性好,即本发明试剂盒可以检测上述磺胺药。

[0150] 实施例 3、检测磺胺药的试纸及其制备与应用

[0151] 一、试纸的结构

[0152] 所述试纸由样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和吸水垫组成;

[0153] 所述样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和吸水垫依次按顺序连接,样品吸收垫的末端与胶体金垫的始端相连,胶体金垫的末端与反应膜的始端相连,反应膜的末端与吸水垫的始端相连;

[0154] 所述胶体金垫上包被有胶体金标记的磺胺药抗体;

[0155] 所述反应膜上有检测区和质控区,检测区(C线)和质控区(T线)均为与所述试纸的长相垂直的条带状;检测区位于近于胶体金垫末端的一侧;质控区位于远离胶体金垫末端的一侧;检测区包被有包被原,质控区包被有鼠抗 HIS 标签单克隆抗体;

[0156] 样品吸收垫为纤维素滤膜,反应膜为硝酸纤维素膜(NC膜);吸水垫为吸水纸;胶体金垫为玻璃纤维膜;样品孔位于试纸顶端。

[0157] 二、试纸的制备

[0158] (1) 胶体金标记抗体 :胶体金标记纯化后的单链抗体 ;

[0159] 胶体金溶液的制备 :取 0.01% 氯金酸水溶液 100mL 用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,持续搅拌的情况下加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 2.5mL,继续搅拌加热 20min,溶液呈透亮的红色。室温冷却,用去离子水恢复到原体积,2-8℃ 保存。

[0160] 用 0.1mol/L K_2CO_3 水溶液调节胶体金溶液 pH 8.2。将 10mL 胶体金溶液加入 50mL 烧杯中,电磁搅拌器 250r/min 搅拌,逐滴加入 1mL 含 0.35mg 单链抗体的溶液,再逐滴加入 3mL 5% (质量百分含量) BSA 水溶液,持续搅拌 10min ;将溶液常温低速 (1500r/min) 离心 20min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀,取红色上清溶液,将红色上清溶液 2-8℃,11000r/min 离心 40min,溶液分为三层,透明上清,管底可流动的暗红色沉淀及管底壁上黑色致密的金颗粒层 ;将可流动的暗红色沉淀转移到另外一个离心管中,用含 1% (质量百分含量) BSA 的 0.01mol/L PBS 缓冲液混悬至原体积,平衡过夜 ;如此重复离心 2 次,最后用 1% BSA 的 0.01mol/L 磷酸缓冲液 (含 0.02% NaN_3) 将沉淀混悬为原体积的 1/40,即得到胶体金标记的单链抗体,2-8℃ 保存。

[0161] (2) 喷金 :将胶体金标记的抗体喷到玻璃纤维上,制成胶体金垫 ;

[0162] (3) 喷膜 :在反应膜上的 T 线和 C 线位置分别喷上包被原和鼠抗 HIS 标签单克隆抗体 ;

[0163] (4) 组装 :将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸水纸按常规方法进行组装,然后切条,将试纸卡装入塑料制卡中,形成试纸卡。

[0164] 三、用试纸进行检测

[0165] (1) 样品前处理及检测

[0166] 猪肉样品 :称 1g 均质后的猪肉样品于试管中,加 5mL 乙酸乙酯,充分混合,离心 (4℃,2000r/min 离心 5min),吸取 1mL 上清液 (乙酸乙酯层),蒸发干燥 ;残留物用复溶液 0.2mL 溶解,逐滴加 4 滴于样品孔中,10min 判断结果,20min 后的结果无效。复溶液是将样品浓缩液稀释 20 倍后得到的。

[0167] (2) 结果判断

[0168] 阴性 :C 线显色,T 线肉眼可见,无论颜色深浅均判为阴性。

[0169] 阳性 :C 线显色,T 线不显色,判为阳性。

[0170] 无效 :C 线不显色,无论 T 线是否显色,该试纸卡均判为无效。

[0171] 四、试纸的效果

[0172] (1) 假阳性率和假阴性率

[0173] 取经 LC-MS/MS 确证的阴性猪肉 (磺胺类药物总体含量小于 50ppb) 50 份,取经 LC-MS/MS 确证的阳性猪肉 (磺胺类药物总体含量大于 100ppb) 50 份。将样品按照实验三中所述方法处理后分别用试纸卡进行检测,计算假阳性率和假阴性率。

[0174] 结果 :在 50 份阴性猪肉样品测定中,试纸卡检测出阳性样品 3 份 (28#、42#、46#),假阳性率为 6%。在 50 份阳性猪肉样品测定中,试纸卡检测出阴性样品 0 份,假阴性率为 0%。

[0175] (2) 试纸卡保存期

[0176] 稳定性试验结果表明,本试纸卡在 2-8℃ 或室温条件下阴凉干燥处可保存 1 年。

序列表

<110> 北京维德维康生物技术有限公司

<120> 一种磺胺药抗体及其应用

<160>2

<210>1

<211>248

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>1

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Asn	Leu	Pro	Ser
1				5					10					15	
Ser	Leu	Ser	His	Leu	Cys	Thr	Val	Leu	Arg	Leu	Phe	Ser	Ser	Thr	Arg
			20					25					30		
Ala	Leu	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Glu	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn
		35					40				45				
Lys	Leu	Glu	Trp	Met	Ala	Ile	Leu	Gln	Ile	Ser	Val	Glu	Ser	Tyr	Asp
	50					55				60					
His	Pro	Asn	Ser	Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln
65				70					75					80	
Ser	Ser	Ala	Ile	Leu	Asn	Ser	Asp	Cys	Thr	Asn	Thr	Ala	Thr	Tyr	Ser
				85				90						95	
Thr	Phe	Ile	Ser	Ile	Leu	Leu	Trp	Thr	Ser	Ala	Lys	Ala	Pro	Leu	Ser
			100					105					110		
Leu	Ser	Pro	Gln	Val	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
		115					120					125			
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Ser	His	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Ala	Val
		130				135					140				
Tyr	Leu	Ala	Leu	Gly	Gly	Pro	Pro	Ser	His	Thr	His	Ile	Thr	Pro	Arg
145				150						155				160	
Thr	Tyr	Ser	Ser	Asp	Ser	Thr	Asp	Asp	Ser	Pro	Gly	Thr	Asn	Arg	Asn
				165				170						175	
Gln	Asp	Ser	His	Pro	Asp	Ser	Ser	Arg	Ser	Ile	Arg	Leu	Asn	Thr	Ser
			180					185					190		
Leu	Gln	Asp	Leu	Asn	Gln	Glu	Ile	Arg	Gly	Pro	Gln	Val	Gln	Trp	Gln
		195					200						205		

Trp Val Trp Asp Arg Leu His Pro Gln His Pro Ser Cys Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Cys Cys Asn Leu Leu Leu Phe Cys Pro Leu Gly His Gln Ala Tyr
 225 230 235 240
 Pro Lys Leu Leu Thr Asn Ala Val
 245

<210>2

<211>744

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

cagggtgcagc tgaaggagtc tgggcctggc ctggtgaact taccatcgtc tctgtcccac 60
 ctctgcactg tcctgaggct cttctcaagc accagagccc tacagaatgt gtccctcagaa 120
 tggatccggc aatttcagg aaacaaactg gagtggatgg ccattcttca aataagtgtc 180
 gagtcatatg accaccctaa tagtgaate tctgtcagtc gagacacatc caagaaccag 240
 tcttctgcaa ttctgaatte tgactgtacg aacacagcca catattcaac atttatatcg 300
 atactattat ggacttcggc caaggcacca ctctcactgt ctccctcaggt ggcgggtggc 360
 ggcggtagcg gcggtggcgg ttctggagge ggcggttctt gcagatcaca cagtttctg 420
 tcccctgctg tatatctggc actgggaggg ccaccatctc atacgcacat tactccgcgt 480
 acatactcat cggacagtac ggatgatagt cctggaacca acagaaacca ggacagccac 540
 ccagactcct cgcgatctat aaggttgaat acttctctgc aagatctcaa tcaagagata 600
 cggggteccc aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcaccctca acatccatcc 660
 tgtggaggag gaggatgctg caacctatta ctgttttgcc ctttggggca tcaggcctat 720
 cccaagttac tcacgaatgc tgtc 744

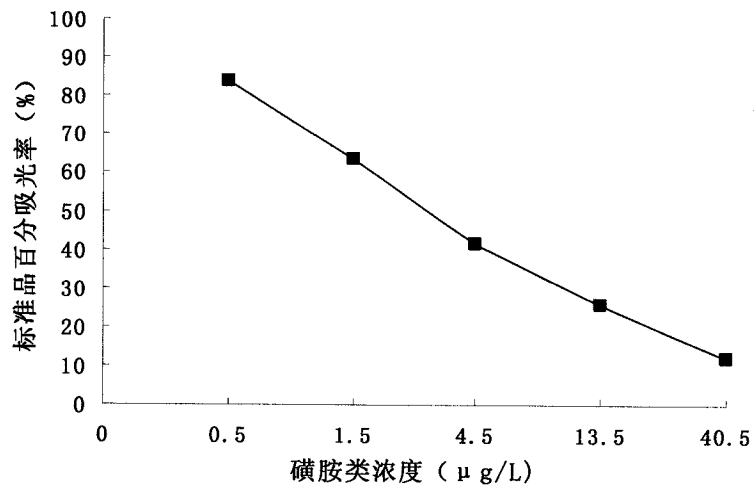


图 1

专利名称(译)	一种磺胺药抗体及其应用		
公开(公告)号	CN101955536B	公开(公告)日	2013-03-20
申请号	CN201010165173.0	申请日	2010-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
[标]发明人	吴小平 王战辉 李杰超 江海洋 徐飞 温凯 王照鹏 王进 王世恩 李娜		
发明人	吴小平 王战辉 李杰超 江海洋 徐飞 温凯 王照鹏 王进 王世恩 李娜		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/566 G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	唐慧		
其他公开文献	CN101955536A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种磺胺药抗体及其应用。该单链抗体由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成，所述重链可变区的氨基酸序列如序列1自N端起第1-118位氨基酸残基所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如序列1自N端起第134-248位氨基酸残基所示。本发明试剂盒和胶体金试纸卡具有灵敏度高、准确度高、精密度高、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点；能同时快速检测大批量样品，可实现现场高通量快速检测。因此，本发明的抗体、试剂盒、胶体金试纸及检测方法在磺胺药的检测中将发挥重大作用。

样品	添加浓度	第一批		第二批		第三批		批间CV%
		回收率%	CV%	回收率%	CV%	回收率%	CV%	
鸡肉	10	85.2	9.1	77.5	8.5	84.3	7.4	10.3
μg/kg	20	72.2	8.2	87.5	7.1	92.7	9.0	11.8
猪肉	10	80.7	7.2	97.5	8.3	80.2	9.9	13.0
μg/kg	20	72.4	8.0	72.5	8.4	86.5	9.3	10.7
牛奶	10	81.1	7.7	90.2	6.9	84.2	8.9	12.9
μg/L	20	83.3	6.4	86.4	8.4	87.6	9.1	11.6