



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101955538 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 26

(21) 申请号 201010165183. 4

C12N 1/19 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 05. 06

C12N 1/21 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

(71) 申请人 北京维德维康生物技术有限公司

G01N 33/566 (2006. 01)

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

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(72) 发明人 沈建忠 江海洋 吴小平 王战辉
李杰超 徐飞 刘丹 王照鹏
王进 王世恩 王奇昌 师伟

(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 任凤华

(51) Int. Cl.

C07K 16/44 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 1/15 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 12 页 序列表 2 页
附图 1 页

(54) 发明名称

一种链霉素抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种链霉素抗体及其应用。该抗体由重链可变区、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 1-123 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 139-248 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链霉素的检测中将发挥重大作用。

1. 一种单链抗体,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 1-123 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 139-248 位氨基酸残基所示。

2. 根据权利要求 1 所述的单链抗体,其特征在于:所述连接所述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 124-138 位氨基酸残基所示。

3. 权利要求 1 或 2 所述单链抗体的编码基因。

4. 根据权利要求 3 所述的编码基因,其特征在于:所述编码基因为如下 1)、2)、3)、4) 或 5) 所示:

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 1-369 位核苷酸所示的 DNA 分子;

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 415-744 位核苷酸所示的 DNA 分子;

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 370-414 位核苷酸所示的 DNA 分子;

4) 序列表中序列 2 所示的 DNA 分子;

5) 在严格条件下与 1)、2) 或 3)、4) 限定的 DNA 序列杂交且具有相同功能的 DNA 分子。

5. 含有权利要求 3 或 4 所述编码基因的重组载体、重组菌、转基因细胞系和表达盒。

6. 权利要求 1 或 2 所述单链抗体在检测链霉素或双氢链霉素中的应用。

7. 一种检测链霉素或双氢链霉素的免疫试剂盒,为下述 1)、2)、3) 或 4) 中任一所述试剂盒:

1) 试剂盒中包括链霉素半抗原与载体蛋白的偶联物、权利要求 1 或 2 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) 试剂盒中包括链霉素半抗原的酶标记物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体和抗体;其中,所述抗体作为包被原;

3) 试剂盒中包括链霉素半抗原的酶标记物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体;其中,权利要求 1 或 2 所述单链抗体作为包被原;

4) 试剂盒中包括链霉素半抗原与载体蛋白的偶联物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体的酶标记物;其中,所述偶联物作为包被原。

8. 根据权利要求 7 所述的免疫试剂盒,其特征在于:

所述试剂盒中包括链霉素标准品溶液、洗涤液和样品稀释液;所述链霉素标准品为硫酸链霉素;

所述链霉素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、40.5 μ 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,具体为 0.01M, pH 值为 7.2-7.6,具体为 7.4;

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;

所述链霉素半抗原与载体蛋白的偶联物是按照如下方法制备得到的:

(1) 将每 145.7mg 链霉素半抗原溶于水中,得到链霉素半抗原的水溶液;将每 21.9mg 羧甲基羟胺半盐酸盐溶于水中,得到羧甲基羟胺半盐酸盐的水溶液;将所述硫酸链霉素的水溶液和所述羧甲基羟胺半盐酸盐的水溶液混合均匀,调节 pH 值至 8.0,25℃磁力搅拌 24h,干燥,将得到的物质记作物质 I;(2) 将所述物质 I 溶于 500 μ L 2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液中,得到的溶液记作溶液 I;将每 20.7mg 碳化二亚胺溶于 200 μ L 20% (体积百分含量)乙醇水溶液中,将得到的溶液记作溶液 II;将 50mg 载体蛋白溶于 1mL MES 缓冲液中,将得到的溶液记作溶液 III;将溶液 I、溶液 II 和溶液 III 混匀,25℃磁力搅拌 24h,将得到的溶液记作溶液 IV;(3) 将所述溶液 IV 进行透析,得到所述链霉素半抗原与载体蛋白的偶联物;

所述链霉素半抗原为硫酸链霉素;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;

所述抗体为鼠抗 HIS 标签单克隆抗体。

9. 一种检测链霉素或双氢链霉素的胶体金试纸,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 或 2 所述单链抗体;所述反应膜上含有检测带和质控带,检测带位置包被有权利要求 8 中所述链霉素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。

10. 一种检测样品中链霉素或双氢链霉素的方法,为如下 I) 或 II) 所示:

I) 检测样品中链霉素或双氢链霉素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 7 或 8 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;将所述待测样品 4000r/min 离心 10min,吸除上层脂肪,得到去除脂肪的待测样品;取 1mL 所述去除脂肪的待测样品与样品稀释液混合,得到的混合溶液即为待测样本溶液;所述去除脂肪的待测样品与样品稀释液的体积比为 1 : 39;

b) 所述待测样品为奶粉;将每 1g 所述待测样品与 40mL 样品稀释液混合均匀,得到的溶液即为待测样本溶液;

c) 所述待测样品为鸡肝;去除所述待测样品中的脂肪,得到去除脂肪的待测样品;将每 5.0 ± 0.05 g 去除脂肪的待测样品的均质物与 20mL PBST 缓冲液混合,振荡 30min,4000r/min 离心 10min,取 2mL 上层清液;将所述 2mL 上层清液与 3mL 正己烷振荡混合 5min,4000r/min 离心 10min,取下层清液;将所述下层清液与样品稀释液混合,得到的混合溶液即为待测样本溶液;所述下层清液与样品稀释液的体积比为 1 : 9;

d) 所述待测样品为鸡肉;去除所述待测样品中的脂肪,得到去除脂肪的待测样品;将每 2 ± 0.05 g 所述去除脂肪的待测样品的均质物与 8mL PBST 缓冲液混合振荡 5min,加入 5mL 正己烷振荡混合 10min,静置 1h,4000r/min 离心 15min,取 1mL 中间层溶液;将所述 1mL 中间层溶液与 1mL 正己烷振荡混合 5min,4000r/min 离心 15min,取下层清液;将所述下层清液与样品稀释液混合,得到的混合溶液即为待测样本溶液;所述下层清液与样品稀释液的体积比为 1 : 9;

e) 所述待测样品为蜂蜜;将每 1 ± 0.05 g 所述待测样品用 10mL 样品稀释液溶解,20℃ -25℃、4000r/min 离心 10min,取上清液,即得到待测样本溶液;

II) 检测样品中链霉素或双氢链霉素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 9 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下述 a) 或 b)：

a) 所述待测样品为牛奶；将所述待测样品与样品稀释液混合,得到的混合溶液即为待测样本溶液；所述待测样品与样品稀释液的体积比为 1 : (4-6) 或 1 : 5；

b) 所述待测样品为蜂蜜；将所述待测样品与样品稀释液混合,得到的混合溶液即为待测样本溶液；所述待测样品与样品稀释液的体积比为 1 : (3-5) 或 1 : 4；

所述样品稀释液为将所述样品浓缩液稀释 20 倍得到的。

一种链霉素抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种链霉素抗体及其应用。

背景技术

[0002] 链霉素 (Streptomycin, STM) 是氨基糖苷类抗生素的一种,对革兰氏阴性菌和部分革兰氏阳性菌特别是结核分枝杆菌具有显著的抗菌活性。链霉素主要作用于细胞的核糖体,通过抑制细菌蛋白质的生物合成而呈现杀菌作用。正是由于其独特的抗菌活性,所以自 1943 年首次在灰色链球菌属中发现链霉素以来,它被广泛应用于多种疾病的治疗和动物饲料添加剂,并在人畜传染病的防治方面发挥了巨大作用。

[0003] 然而,链霉素对人又有一定的、有时甚至是严重的毒副作用。链霉素引起的主要毒副作用是耳毒性。因其能选择性地损害第 8 对脑神经,导致前庭功能损害和耳蜗神经损害,严重时可能造成永久性的耳聋,长期使用还会使细菌产生耐药性。为了保障动物源性食品的安全,欧盟、美国及我国等很多国家都对链霉素在动物源性食品中残留制定了最大残留限量 (MRL)。链霉素目前一般采用 HPLC 或 LC/MS,但这类方法样本前处理及测定操作烦琐,检测所需时间较长,检测费用高,推广使用受到限制。

[0004] 酶联免疫吸附实验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,在不同的载物上进行有毒物质残留分析的方法,具有操作简便快速、成本低、灵敏度较高、分析样本量大的优点。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链霉素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 1-123 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 139-248 位氨基酸残基所示。

[0007] 上述单链抗体中,所述连接所述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 124-138 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 1-369 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 415-744 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 370-414 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)、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链霉素或双氢链霉素中的应用也属于本发明的保护范围。

[0016] 本发明的另一个目的是提供一种检测链霉素或双氢链霉素的免疫试剂盒。

[0017] 本发明所提供的检测链霉素或双氢链霉素的免疫试剂盒, 为下述 1)、2)、3) 或 4) 中任一所述试剂盒：

[0018] 1) 试剂盒中包括链霉素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) 试剂盒中包括链霉素半抗原的酶标记物、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) 试剂盒中包括链霉素半抗原的酶标记物、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) 试剂盒中包括链霉素半抗原与载体蛋白的偶联物、上述任一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, 所述试剂盒中包括链霉素标准品溶液、洗涤液和样品稀释液；所述链霉素标准品为硫酸链霉素；

[0023] 所述链霉素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、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] 所述链霉素半抗原与载体蛋白的偶联物是按照如下方法制备得到的：

[0027] (1) 将每 145.7mg 链霉素半抗原溶于水中, 得到链霉素半抗原的水溶液；将每 21.9mg 羧甲基羟胺半盐酸盐溶于水中, 得到羧甲基羟胺半盐酸盐的水溶液；将所述硫酸链霉素的水溶液和所述羧甲基羟胺半盐酸盐的水溶液混合均匀, 调节 pH 值至 8.0, 25 $^{\circ}$ C 磁力搅拌 24h, 干燥, 将得到的物质记作物质 I；(2) 将所述物质 I 溶于 500 μ L 2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液中, 得到的溶液记作溶液 I；将每 20.7mg 碳化二亚胺溶于 200 μ L 20% (体积百分含量) 乙醇水溶液中, 将得到的溶液记作溶液 II；将 50mg BSA 溶于 1mL MES 缓冲液中, 将得到的溶液记作溶液 III；将溶液 I、溶液 II 和溶液 III 混匀, 25 $^{\circ}$ C 磁力搅拌 24h, 将得到的溶液记作溶液 IV；(3) 将所述溶液 IV 进行透析, 得到所述链霉素半抗原与载体蛋白的偶联物；

[0028] 所述链霉素半抗原为硫酸链霉素；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；

[0029] 所述抗体为鼠抗 HIS 标签单克隆抗体。

[0030] 所述样品稀释液为将所述样品浓缩液稀释 20 倍得到的。

[0031] 本发明的另一个目的是提供一种检测链霉素或双氢链霉素的胶体金试纸。

[0032] 本发明所提供的检测链霉素或双氢链霉素的胶体金试纸，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；所述反应垫上含有检测带和质控带，检测带位置包被有上述任一所述链霉素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；所述链霉素半抗原为链霉素。

[0033] 本发明的另一个目的是提供一种检测样品中链霉素或双氢链霉素的方法。

[0034] 本发明所提供的检测样品中链霉素或双氢链霉素的方法，为如下 I) 或 II) 所示：

[0035] I) 检测样品中链霉素或双氢链霉素的方法包括如下步骤：

[0036] 1) 将待测样品进行前处理，得到待测样本溶液；

[0037] 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；

[0038] 所述前处理的方法为下述 a)、b)、c)、d) 和 e) 中的任一：

[0039] a) 所述待测样品为牛奶；将所述待测样品 4000r/min 离心 10min，吸除上层脂肪，得到去除脂肪的待测样品；取 1mL 所述去除脂肪的待测样品与样品稀释液混合，得到的混合溶液即为待测样本溶液；所述去除脂肪的待测样品与样品稀释液的体积比为 1 : 39；

[0040] b) 所述待测样品为奶粉；将每 1g 所述待测样品与 40mL 样品稀释液混合均匀，得到的溶液即为待测样本溶液；

[0041] c) 所述待测样品为鸡肝；去除所述待测样品中的脂肪，得到去除脂肪的待测样品；将每 5.0 ± 0.05 g 去除脂肪的待测样品的均质物与 20mL PBST 缓冲液混合，振荡 30min，4000r/min 离心 10min，取 2mL 上层清液；将所述 2mL 上层清液与 3mL 正己烷振荡混合 5min，4000r/min 离心 10min，取下层清液；将所述下层清液与样品稀释液混合，得到的混合溶液即为待测样本溶液；所述下层清液与样品稀释液的体积比为 1 : 9；

[0042] d) 所述待测样品为鸡肉；去除所述待测样品中的脂肪，得到去除脂肪的待测样品；将每 2 ± 0.05 g 所述去除脂肪的待测样品的均质物与 8mL PBST 缓冲液混合振荡 5min，加入 5mL 正己烷振荡混合 10min，静置 1h，4000r/min 离心 15min，取 1mL 中间层溶液；将所述 1mL 中间层溶液与 1mL 正己烷振荡混合 5min，4000r/min 离心 15min，取下层清液；将所述下层清液与样品稀释液混合，得到的混合溶液即为待测样本溶液；所述下层清液与样品稀释液的体积比为 1 : 9；

[0043] e) 所述待测样品为蜂蜜；将每 1 ± 0.05 g 所述待测样品用 10mL 样品稀释液溶解， $20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$ 、4000r/min 离心 10min，取上清液，即得到待测样本溶液；

[0044] II) 检测样品中链霉素的方法包括如下步骤：

[0045] 1) 将待测样品进行前处理，得到待测样本溶液；

[0046] 2) 用上述任一所述胶体金试纸对所述待测样本溶液进行检测；

[0047] 所述前处理的方法为下述 a) 或 b)：

[0048] a) 所述待测样品为牛奶;将所述待测样品与样品稀释液混合,得到的混合溶液即为待测样本溶液;所述待测样品与样品稀释液的体积比为 1:(4-6) 或 1:5;

[0049] b) 所述待测样品为蜂蜜;将所述待测样品与样品稀释液混合,得到的混合溶液即为待测样本溶液;所述待测样品与样品稀释液的体积比为 1:(3-5) 或 1:4。

[0050] 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;

[0051] 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。

[0052] 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 $2.61 \times 10^9 \text{L/mol}$ 、半数抑制量 (IC_{50}) 为 0.75ng/mL。本发明为食品中链霉素残留检测方法的建立提供高效价、高特异性的抗体来源。

[0053] 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链霉素的检测中将发挥重大作用。

附图说明

[0054] 图 1 为试剂盒标准曲线。

具体实施方式

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 实施例 1、抗体的制备及功能检测

[0058] 一、链霉素单链抗体的制备

[0059] (一) 抗体的筛选

[0060] 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。使用全套引物, 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, 经叠加延伸聚合酶链式反应 (Overlap-PCR) 将 VH、VL 基因随机拼接为单链抗体基因 (ScFv), 然后将 ScFv 与载体 pCANTAB5E 连接得 pCANTAB5E/ScFv, 并转化大肠杆菌 TG1, 即得到鼠源非免疫单链抗体库。用 ELISA 方法筛选得到带有特异性的多种抗链霉素的单链抗体的噬菌体颗粒, 通过测序得到其相应的核苷酸序列。

[0061] 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列表中序列 1 所示, 自序列 1 的 N 端起第 1-123

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 139-248 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 124-138 位氨基酸残基为短肽序列。

[0062] 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 1-369 位核苷酸编码重链可变区,自序列 2 的 5' 末端起第 415-744 位核苷酸编码轻链可变区,自序列 2 的 5' 末端起第 370-414 位核苷酸编码短肽。

[0063] (二) 抗体的制备

[0064] 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。

[0065] 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 Xba I 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。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 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)。

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 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 标记的硫酸链霉素杂交,用 ECL 发光液检测发光条带。硫酸链霉素购自美国 Sigma-Aldrich 公司,产品目录号为 46754。

[0072] 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。

[0073] Western blot 检测结果表明:1) 实验组得到的蛋白具有与链霉素结合的功能,蛋白的分子量为 28kd,与预期的蛋白分子量一致,表明目的蛋白为与链霉素结合的抗体。2) 对照组没有检测到任何与链霉素结合的蛋白条带。

[0074] 1、用 ELISA 方法,检测抗体的半抑制率 (IC_{50}):

[0075] a、将实施例 2 中制备得到的偶联物 (STM-BSA) 用包被缓冲液溶解,得到 STM-BSA 的溶液 (该溶液中 STM-BSA 的浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$)。包被缓冲液:pH9.6、0.1mol/L 的碳酸钠缓冲液。

[0076] 向 96 孔板的孔中加入 STM-BSA 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。

[0077] b、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。

[0078] c、向孔中加入单链抗体溶液和不同浓度的链霉素标准品溶液,各 50 μL 每孔,37℃孵育 1 小时。以只加入单链抗体溶液不加入链霉素标准品溶液的孔作阳性对照。

[0079] 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。

[0080] 不同浓度的链霉素溶液的制备:用样品稀释液稀释链霉素得到溶液。

[0081] 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;

[0082] 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。

[0083] 实验设 3 次重复。

[0084] 结果如下:

[0085] 1) 吸光度值与每孔所加入的标准品溶液中链霉素的浓度成反比;证明,所表达纯

化得到的单链抗体具有针对链霉素的结合特异性,并呈现线性关系,说明该抗体可用于对链霉素的免疫检测。

[0086] 2) 半抑制率 (IC_{50}): 阳性对照孔 (即不添加链霉素标准品溶液的孔) 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% 时所对应的链霉素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 0.75ng/mL。

[0087] 2、抗体的亲和常数测定

[0088] 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。

[0089] 结果: 抗体的亲和常数为 $2.61 \times 10^9 L/mol$ 。

[0090] 实施例 2、检测链霉素的酶联免疫试剂盒及其制备

[0091] 一、酶联免疫试剂盒由下述物质组成:

[0092] 1、包被链霉素与载体蛋白偶联物 (STM-BSA) 的酶标板;

[0093] 2、链霉素抗体: 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;

[0094] 3、链霉素标准品: 链霉素标准品为硫酸链霉素, 标准品溶液浓度分别为 $0 \mu g/L$ 、 $0.5 \mu g/L$ 、 $1.5 \mu g/L$ 、 $4.5 \mu g/L$ 、 $13.5 \mu g/L$ 、 $40.5 \mu g/L$; 硫酸链霉素购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 产品目录号为 46754; 用样品稀释液稀释成上述各浓度;

[0095] 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;

[0096] 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;

[0097] 6、终止液: 0.2M 硫酸水溶液;

[0098] 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;

[0099] 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。

[0100] 二、试剂盒组分的制备

[0101] (一) 包被原的制备

[0102] 硫酸链霉素购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 产品目录号为 46754;

[0103] (1) 将 145.7mg 硫酸链霉素溶于超轻水 (DDW) 中, 得到硫酸链霉素的水溶液; 将 21.9mg 羧甲基羟胺半盐酸盐溶于超轻水 (DDW) 中, 得到羧甲基羟胺半盐酸盐的水溶液; 将硫酸链霉素的水溶液和羧甲基羟胺半盐酸盐的水溶液混合均匀, 用浓度为 1mol/L 的碳酸钠缓冲液将其 pH 值调至 8.0, 室温 (25°C) 磁力搅拌 24h; 再将该混合物置真空干燥箱, 45°C 烘干称重, 将得到的物质记作物质 I, 称得该物质 I 的重量为 100mg;

[0104] (2) 将 100mg 物质 I 溶于 500 μL 2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (MES) 缓冲液中, 得到的溶液记作溶液 I;

[0105] 将 20.7mg 碳化二亚胺 (EDC) 溶于 200 μL 20% (体积百分含量) 乙醇水溶液中,

将得到的溶液记作溶液 II ；

[0106] 将 50mgBSA 溶于 1mL MES 缓冲液中,将得到的溶液记作溶液 III ；

[0107] 将溶液 I 、溶液 II 和溶液 III 混匀,室温 (25℃) 磁力搅拌 24h,将得到的溶液记作溶液 IV ；

[0108] (3) 将溶液 IV 在 4℃ 下对 PBS(pH7.2) 透析,透析后的反应液进一步用葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 纯化,制得人工抗原 STM-BSA,冻干 -20℃ 保存备用。

[0109] (二) 包被有包被原的酶标板及其制备

[0110] 包被有合成抗原 STM-BSA 的聚苯乙烯酶标板 :用 10mM 的碳酸盐溶液将抗原作 1 : 50000 倍稀释 (6.0 μ g/mL),包被 96 孔聚苯乙烯酶标板,每孔 100 μ L,37℃ 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 μ L 封闭液,37℃ 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 :pH9.6、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] (一) 样品前处理

[0115] 1、检测样本为牛奶 :取牛奶样品,4000r/min 离心 10min,吸除上层脂肪 ;取 1mL 去除脂肪的牛奶样品至 15mL 玻璃管中 ;用样品稀释液按 1 : 40 比例进行稀释 (即 50 μ L 牛奶样品加入 1950 μ L 样品稀释液)。取 50 μ L 用于分析。

[0116] 2、检测样本为奶粉 :称取 1g 奶粉,溶于 40mL 样品稀释液中,混合均匀,取 50 μ L 用于检测。

[0117] 3、检测样本为鸡肝 :除去肝脏中的脂肪部分,用均质器均质肝脏样品 ;称取 5.0 ± 0.05 g 均质物至 50mL 聚苯乙烯离心管中,加入 20mL PBST 缓冲液混合振荡 30min ;4000r/min 离心 10min ;移取 2mL 上层清液至 10mL 玻璃离心管中,加入 3mL 正己烷用振荡器充分振荡 5min ;4000r/min 离心 10min ;除去上层,取下层清液用样品稀释液按 1 : 10 体积比进行稀释 (50 μ L 下层清液加入 450 μ L 样品稀释液) ;取 50 μ L 水相进行分析。

[0118] 4、检测样本为鸡肉 :除去鸡肉中的脂肪部分,用均质器均质鸡肉样品 ;称取 2 ± 0.05 g 均质物至 50mL 聚苯乙烯离心管中,加入 8mL PBST 缓冲液混合振荡 5min,加入正己烷 5mL 充分上下振荡混合 10min 后静置 1h ;4000r/min 离心 15min ;移取 1mL 中间层溶液至 10mL 玻璃离心管中,加入 1mL 正己烷,用振荡器充分振荡 5min,4000r/min 离心 15min ;除去上层,取下层清液用样品稀释液按 1 : 10 体积比进行稀释 (50 μ L 下层清液加入 450 μ L 样品稀释液) ;取 50 μ L 用于分析。

[0119] 5、检测样本为蜂蜜 :称取 1 ± 0.05 g 蜂蜜样品至 50mL 聚苯乙烯离心管中,加入 10mL 样品稀释液,用振荡器振荡 10min 至蜂蜜全部溶解,4000r/min、室温 (20-25℃) 离心 10min,直至清亮,取上清液 50 μ L 进行分析。

[0120] (二) 用试剂盒检测

[0121] 1、标准曲线的制作

[0122] 向包被有包被原的酶标板微孔中加入链霉素标准品溶液 50 μ L,再加入链霉素抗

体工作液 50 μ L, 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μ L 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 μ L, 37 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15min, 每孔加入终止液 50 μ L, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪, 测定每孔吸光度值。

[0123] 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 (B_0) 再乘以 100%, 得到百分吸光度值。以链霉素标准品浓度 (μ g/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。

[0124] 百分吸光度值 (%) = $(B/B_0) \times 100\%$

[0125] 2、样品中链霉素浓度的测定

[0126] 向包被有包被原的酶标板微孔中加入检测样本溶液 50 μ L, 再加入链霉素单链抗体工作液 50 μ L, 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μ L 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抗体工作液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 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 μ L, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15min, 每孔加入终止液 50 μ L, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪, 测定每孔吸光度值。

[0127] 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 (B_0) 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出样本溶液中链霉素的残留量。

[0128] 四、试剂盒检测效果评价

[0129] (一) 准确度和精密度试验

[0130] 向不含链霉素的样品 (牛奶、蜂蜜、鸡肉和鸡肝) 中添加链霉素标准品, 使链霉素标准品在样品中的终浓度分别为 5、10 和 20 μ g/L 或 μ g/kg;

[0131] 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, 检测方法如实验三中所述, 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 精密度测定结果统计表

[0134]

样品	添加浓度 1 (5)			添加浓度 2 (10)			添加浓度 3 (20)		
	平均 RG	批内 CV	批间 CV	平均 RG	批内 CV	批间 CV	平均 RG	批内 CV	批间 CV
牛奶 ($\mu\text{g/L}$)	95.3	6.7	9.7	118.2	7.0	9.3	125.9	6.8	11.9
	107.6	8.0		103.7	8.1		97.3	7.3	
	97.3	7.3		94.6	7.6		103.2	7.5	
蜂蜜 ($\mu\text{g/kg}$)	87.9	6.8	9.2	86.7	7.2	10.8	97.2	7.8	9.5
	106.1	8.2		93.4	6.6		111.5	8.2	
	99.7	7.1		106.3	7.0		94.8	7.6	
鸡肉 ($\mu\text{g/kg}$)	112.5	7.8	8.8	112.8	7.1	10.7	116.4	7.2	11.6
	97.6	7.7		103.1	6.5		96.7	7.2	
	101.4	6.3		89.4	6.2		83.1	8.0	
鸡肝 ($\mu\text{g/kg}$)	81.3	6.6	11.5	92.5	8.1	9.8	95.3	7.7	10.2
	94.8	8.0		105.3	6.9		120.7	6.7	
	96.2	6.7		110.2	7.5		91.2	7.8	

[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：所有样品的添加回收率在 81.3%~125.4%，批内变异系数在 6.5%~8.2%，批间变异系数在 8.8%~11.9%。

[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、链霉素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] 选择相应的物质，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]

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起50\%抑制的链霉素浓度}}{\text{引起50\%抑制的相应物质浓度}} \times 100 \%$$

[0147] 表 1 试剂盒的特异性

	药物名称	交叉反应率 (%)
	链霉素	100.0
	双氢链霉素	147.0
	庆大霉素	<0.1
	新霉素	<0.1
[0148]	卡那霉素	<0.1
	氯霉素	<0.1
	磺胺	<0.1
	呋喃妥因	<0.1
	呋喃它酮	<0.1
	呋喃唑酮	<0.1

[0149] 实验表明,本发明试剂盒对链霉素和双氢链霉素的特异性好,即本发明试剂盒可以检测链霉素和双氢链霉素。

[0150] 实施例 3、检测链霉素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链霉素抗体(序列表中序列 1 所示蛋白);

[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;胶体金垫为包被有胶体金标记的链霉素抗体的玻璃纤维膜;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：

[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] 0.1mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液 pH 8.2。将 10mL 胶体金溶液中加入 50mL 烧杯中，电磁搅拌器 250r/min 搅拌，逐滴加入 1mL 含 0.35mg 单链抗体溶液。逐滴加入 3mL 5% BSA，持续搅拌 10min。金标抗体溶液常温低速 (1500r/min) 离心 20min，弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀。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 i% BSA 的 0.01mol/L 磷酸缓冲液混悬至原量。平衡过夜，同上重复离心 2 次。最后用 i% BSA 的 0.01mol/L PB (含 0.02% NaN_3) 将沉淀混悬为原体积的 1/40，2-8℃ 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：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、用试纸卡进行检测

[0165] (1) 样品前处理及检测

[0166] 1、检测样本为新鲜牛奶：新鲜牛奶直接用样品稀释液进行稀释后检测，稀释 5 倍，混匀；所述待测样品与样品稀释液的体积比为 1 : 5；

[0167] 2、检测样本为蜂蜜：直接用样品稀释液进行稀释后检测，稀释倍数 4 倍，混匀；所述待测样品与样品稀释液的体积比为 1 : 4；

[0168] 取出试纸卡，开封后平放于桌面，吸取待测液逐滴加入 4 滴于样品孔中；5-10min 判断结果，15min 后的判断结果无效。

[0169] (2) 结果判断

[0170] 阴性：C 线显色，T 线肉眼可见，无论颜色深浅均判为阴性。

[0171] 阳性：C 线显色，T 线不显色，判为阳性。

[0172] 无效：C 线不显色，无论 T 线是否显色，该试纸卡均判为无效。

[0173] 四、试纸卡的效果

[0174] (1) 假阳性率和假阴性率

[0175] 取经 LC-MS/MS 确证的阴性牛奶 (含链霉素 < 100.0 μ g/L) 和阴性蜂蜜样品 (含链霉素 < 40.0 μ g/kg) 各 50 份，取经 LC-MS/MS 确证的阳性牛奶 (含链霉素 \geq 100.0 μ g/L) 和阳性蜂蜜 (含链霉素 \geq 40.0 μ g/kg) 样品各 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，计算假阳性率和假阳性率。

[0176] 结果：在 50 份阴性猪肉样品测定中，试纸卡检测阳性样本 3 个，假阳性率 6%。在 50 份阳性猪肉样品测定中，试纸卡检测出阴性样本 0 个，假阴性率为 0%。

[0177] (2) 试纸卡保存期

[0178] 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> 一种链霉素抗体及其应用

<160>2

<210>1

<211>248

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>1

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

Pro Gln His Pro Ser Ser Ser Gly Cys Cys Lys Gly Leu Gly Leu Leu
 210 215 220
 Ser His Cys Ile Ile Arg Ser Met Tyr Ala Arg Phe Leu Gln Glu Arg
 225 230 235 240
 Gln Val Thr His Glu Cys Cys Arg
 245

<210>2

<211>744

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>2

caggtgtacc tgtcccacct cctgctgcag gagaccggcc acggcgcctt ggtgcagcct 60
 gtccctgcggt cgtctttgcac tctctttctca agctgcccac cagagcgaaa ttgtctctca 120
 cacatcccat ggtccaatca ggcaatttcc aggatacaaaa ctggtgtgca tggcgaatac 180
 ttctatgact ctcaaagaga ttatgcatta tcacgaaact cggactgttc tgtcagtcga 240
 gacacaacat ccaagaacce gtcttctgca attcttaata cgaacgccac aatcggacag 300
 tacgtataca tcagtgtcga gtcactacag aaggccaagg caccactctc actgtctcct 360
 caggtggcgg gtggcggcgg tagcggcggt ggcggttctg gaggcggcgg ttcttgcaga 420
 tcaactcaatt tctgttcccc tgcagtatat ctggcaatgg gaggaccacc atctcatacg 480
 caagctcgcg catcctcgga ttcagatggc tccaacagat accaggacag caaccagac 540
 tcatctatct cgcggcctac tcttttgcce ttgtacttcc taccgcccct gattcagtgg 600
 cagtgggtgt acgacagact tcaccctcaa catccatcct catcgggatg ctgcaaaggc 660
 ctaggattac tgtctcattg catcatecgt tctatgtacg caaggtttct gcaagaacgc 720
 caagttactc acgaatgctg tcga 744

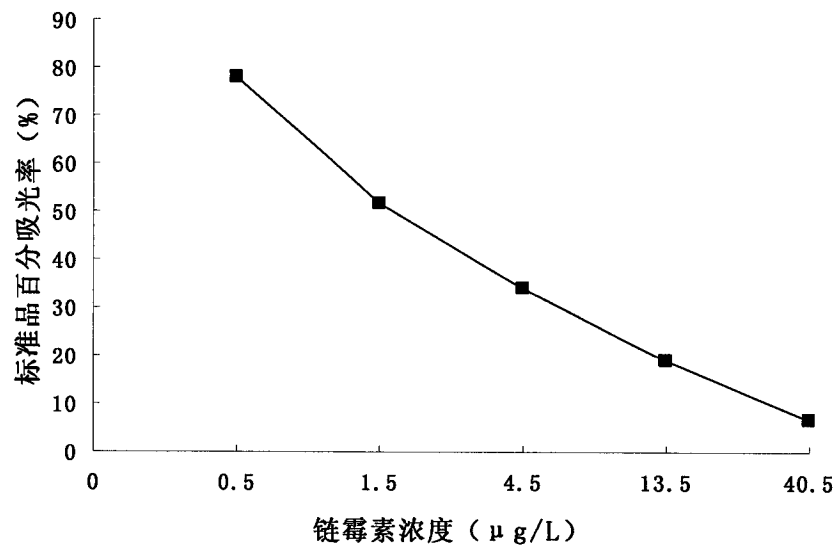


图 1

专利名称(译)	一种链霉素抗体及其应用		
公开(公告)号	CN101955538A	公开(公告)日	2011-01-26
申请号	CN201010165183.4	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	沈建忠 江海洋 吴小平 王战辉 李杰超 徐飞 刘丹 王照鹏 王进 王世恩 王奇昌 师伟		
发明人	沈建忠 江海洋 吴小平 王战辉 李杰超 徐飞 刘丹 王照鹏 王进 王世恩 王奇昌 师伟		
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		
其他公开文献	CN101955538B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种链霉素抗体及其应用。该抗体由重链可变区、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1-123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139-248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链霉素的检测中将发挥重大作用。

