



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102321177 B

(45) 授权公告日 2013.05.01

(21) 申请号 201110285843.7

(22) 申请日 2011.09.23

(73) 专利权人 福州大学

地址 350108 福建省福州市闽侯县上街镇大学城学园路2号福州大学新区

(72) 发明人 吕曦 黄爱玲

(74) 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100

代理人 蔡学俊

(51) Int. Cl.

C07K 16/44 (2006.01)

C12N 15/11 (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)

G01N 33/53 (2006.01)

审查员 宋梦

权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

一种抗三聚氰胺单链抗体及其应用体

(57) 摘要

本发明提供了一条兔源抗三聚氰胺的单链抗体序列,其轻链可变区的氨基酸序列和重链可变区氨基酸序列如 SEQIDNo. 1 和 SEQIDNo. 2 所示。该抗体是利用噬菌体表面展示技术筛选获得。本发明的单链抗体特异性识别三聚氰胺,与含三聚氰胺的奶制品有明显的酶联免疫反应。可将本发明用于食品和饲料中三聚氰胺含量的检测。

1. 一种抗三聚氰胺单链抗体,其轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No. 1,重链可变区氨基酸序列如SEQ ID No. 2 所示。
2. 如权利要求 1 所述的抗三聚氰胺单链抗体,其特征在于,编码轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No. 3,编码重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No. 4 所示。
3. 权利要求 1-2 任一项所述的抗三聚氰胺单链抗体在检测三聚氰胺中的应用。

一种抗三聚氰胺单链抗体及其应用体

技术领域

[0001] 本发明涉及噬菌体展示技术和基因工程抗体技术,特别是涉及一种抗三聚氰胺单链抗体;本发明还涉及该抗体在检测三聚氰胺样品中的应用。

背景技术

[0002] 三聚氰胺(melamine)简称三胺,由德国化学家 Justus von Liebig 于 1834 年首次合成,学名三氨三嗪。三聚氰胺是一种重要的氮杂环有机化工原料,它主要用于生产三聚氰胺—甲醛树脂,同时广泛用于木材、塑料、涂料、造纸、纺织、皮革、电气、医药等行业。比如,现代工艺多采用尿素合成的三聚氰胺树脂常常被用于生产制作食品包装或餐具,因此通过用三聚氰胺树脂为原材料的食品包装或餐具会将三聚氰胺迁移至食品中。杀虫剂灭蝇胺的代谢产物三聚氰胺沿食物链富集进入植物或动物源食物也会导致食品中污染三聚氰胺。慢性高剂量摄入三聚氰胺会诱发肾脏病理学,引起动物肾脏功能衰竭甚至导致死亡。由于三聚氰胺与蛋白质相比含有更多的氮原子,所以添加在食品中的三聚氰胺可以造成食品蛋白质含量较高的假象,因而常被不法商贩所利用。三聚氰胺被投机者用作食品添加剂,给人类生活带来了很大的安全隐患,因此迫切需要快速、准确、有效的检测方法来监测食物中的三聚氰胺残留。

[0003] 免疫学检测方法具有操作简便、快速、检测成本低、通量高、对技术人员的要求低的优点,适合于三聚氰胺的现场检测。采用 ELISA 方法检测三聚氰胺,需要抗三聚氰胺的抗体。以抗原免疫动物获得多抗血清是制备抗体的经典方法,但制备周期长,得到的抗体量有限。B 淋巴细胞杂交瘤技术获得单克隆抗体,其特异性强,性质均一,但不易于大批量发酵生产。通过抗体分子基因水平的重组可获得多种多样的特异性抗体,使单克隆抗体的研制有了重要进展。已有研究报道,重组单链抗体(scFv)能够保留与亲本单克隆抗体(mcAb)结构相一致的抗原识别位点。噬菌体抗体库技术的产生为筛选获得高灵敏性重组抗体提供了简便而高效的操作系统。将筛选得到的重组抗体基因导入表达宿主中,能实现特异性抗体的大量生产。

发明内容

[0004] 本发明的第一个目的在于提供一种重组单链抗体序列,该抗体能特异性结合三聚氰胺,可被用于检测食品、水产品、饲料等样品中三聚氰胺的含量。

[0005] 本发明的第二个目的在于提供编码上述单链抗体的基因。

[0006] 本发明的第三个目的在于提供上述抗体在制备三聚氰胺检测试剂中的应用。

[0007] 本发明提供的一种抗三聚氰胺单链抗体,其轻链可变区的氨基酸序列和重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2 所示。

[0008] 本发明还提供了编码上述抗体的基因。编码轻链可变区的核苷酸序列和编码重链可变区的核苷酸序列如 SEQ ID No. 3 和 SEQ ID No. 4 所示。

[0009] 本发明还提供了一种将上述的抗体经过改造得到的衍生抗体,所述改造包括氨基

酸的缺失、替换或插入，并且不改变抗体的活性。

[0010] 含有本发明所述基因的表达载体及表达载体的宿主均属于本发明的保护范围。

[0011] 一种与 SEQ ID No. 1 具有至少 90% 同源性且编码相同功能蛋白质的序列，以及一种与 SEQ ID No. 2 具有至少 90% 同源性且编码相同功能蛋白质的序列，也在本发明的保护范围之内。

[0012] 本发明还提供了上述抗体在检测三聚氰胺中的应用。

[0013] 本发明应用噬菌体表面展示技术，通过抗体基因工程技术构建了兔源抗三聚氰胺抗体文库，并筛选获得特异抗三聚氰胺抗体 scFv 片段，获得的 scFv 片段命名为 B4-scFv。

[0014] B4-scFv 特异性的轻链和重链可变区基因来源于对兔源抗三聚氰胺单链抗体文库的特异性富集筛选，该抗体库的建立来源于日本大耳兔的脾脏细胞基因。抗体蛋白功能由存在于抗体基因轻链和重链可变区的抗原决定簇互补区域 CDRs 中特异性核苷酸序列决定，6 个相应的 CDRs 区氨基酸序列构成了抗体的特异性抗原结合区域，决定发明中抗体的抗原结合特征(表 1)。

[0015] 表 1 B4-scFv 抗体的轻链和重链高可变区序列

[0016]

scFv	VR	CDR1	CDR2	CDR3
B4-scFv	VL	Ser Gln Ser Ile Ser Thr Ala Leu Ala Trp Tyr	Tyr Ala Ala Ser Lys Leu Ala Ser	Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Asn Gly
	VH	Ile Asp Leu Ser Ser Asn Ala	Ile Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg	Gly Arg phe Ser Leu Trp Gly Pro

[0017] B4-scFv 轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID No. 1 所示，其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示。编码 B4-scFv 轻链可变区的基因序列如 SEQ ID No. 3 所示，重链可变区的基因序列如 SEQ ID No. 4 所示。

[0018] 将上述编码 scFv 基因克隆到表达载体中，进而转化宿主 Rosseta 中，通过诱导表达获得 scFv 抗体。利用 SDS-PAGE 和 ELISA 对获得的 B4-scFv 抗体进行功能鉴定，结果表明 B4-scFv 对三聚氰胺有特异性结合，并且能灵敏的检测出牛奶样品中三聚氰胺。

[0019] 本发明的 B4-scFv 蛋白可制备三聚氰胺检测试剂，用于检测食品、水产品、饲料等样品中的三聚氰胺残留量。

附图说明

[0020] 图 1 为抗三聚氰胺单链抗体 B4-scFv 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图；其中(M) 蛋白 marker；(1) 非诱导的 Rosseta 菌的周质蛋白提取液；(2) B4 菌的周质蛋白提取液；(3) 纯化的 B4-scFv。

[0021] 图 2 为 B4-scFv 的三聚氰胺标准抑制曲线。

具体实施方式

[0022] 下面结合附图和实施例,对本发明的具体实施方式做进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用于限制本发明的范围。

[0023] 材料与amp;方法

[0024] 1. 载体、菌株 :噬菌体 VCSM13,噬菌质粒 pComb3,菌株 XL1-Blue 均为美国 Scripps 研究所提供。

[0025] 2. 主要试剂

[0026] 明胶、牛血清白蛋白(BSA)购自上海生工生物工程有限公司 ;TRIZOLreagent 试剂为 Invitrogen 公司产品 ;cDNA 合成试剂盒和 *sfiI* 限制性内切酶为 Fermentas 公司产品 ;T4DNA 连接酶、胶回收试剂盒、核酸 marker 和蛋白质 marker 均购自 TaKaRa 公司 ;2×Taq PCR MasterMix 购自天根生化科技有限公司 ;Goat HRP/anti-HA conjugate 抗体为南京金斯瑞公司产品 ;PCR 引物均为 Invitrogen 公司合成。

[0027] 3. 抗原制备

[0028] 采用戊二醛做交联剂 (Avrameas, 1969),使牛血清白蛋白(BSA)载体和三聚氰胺的氨基以共价键连接合成免疫全抗原。具体制备如下 :将 630mg 三聚氰胺溶于 50mL 的甘油中备用 ;另外取 200mg BSA 溶于 25mL 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)制成 BSA 溶液 ;将三聚氰胺溶液在搅拌下缓慢加入 BSA 溶液中 ;搅拌均匀后,再缓慢滴入 0.4mL25% 戊二醛溶液,搅拌反应 4h 后,在 4℃ 下将合成产物用 PBS (pH7.2)透析 3d,并用超滤离心管浓缩产物,4℃ 冰箱保存。

[0029] 4. 动物免疫

[0030] 准备 4 只健康的雄性日本大白兔(购自福建医科大学动物实验中心),分两组,2 只加步骤 3 制备的完全抗原,另 2 只为对照组,免疫前各分别采取血样,测血清效价。免疫抗原剂量为 0.5mL/ 只,实验组加制备的完全抗原,对照组加生理盐水,采用皮下多点注射。14d 后进行第 2 次免疫,免疫的剂量为第一次的 1/4 ;8d 后,从耳缘静脉取 1mL 血,制备血清,检测抗体效价。此后每隔 14d 加强免疫 1 次,8d 后测效价。两个月后,当效价不再上升时,采用心脏采血并获得兔子脾脏。

[0031] 5. 引物设计

[0032] 如表 2 所示,针对 κ 型轻链可变区共设计了 3 条上游引物和 3 条下游引物,可组合成 9 对引物 ; λ 型轻链可变区仅设计了 1 对引物。这 10 对引物的上游引物 5' 端含有内切酶 *SfiI* 酶切位点,下游引物 5' 端含有连接片段(linker)序列。针对重链可变区共设计了 4 条上游引物和 1 条下游引物,可组合成 4 对引物。这 4 对引物的上游引物 5' 端含有连接片段(linker)序列,下游引物 5' 端含有 *SfiI* 酶切位点。Linker 序列编码七个氨基酸(GGSSRSS)。另外,设计 1 对引物用于扩增 scFv。

[0033] 表 2 兔源 scFv 文库构建引物

[0034]

引物(5' -3')
(1) V _H 5' sense Primers
RSCVK1:GGG0CCAGGG0CCGAGCTCGTGTGACCCAGACTCCA
RSCVK2:GGG0CCAGGG0CCGAGCTCGATMTGACCCAGACTCCA
RSCVK3:GGG0CCAGGG0CCGAGCTCGTGATGACCCAGACTGAA
(2) V _H 3' Reverse Primers
RKB9J1 ₀ -B:GGAAGATCTAGAGGAACCAOCTTTGATTTCACATTTGGTGCC
RKB9J ₀ -B:GGAAGATCTAGAGGAACCAOCTAGGATCTCCAGCTCGGTCCC
RKB42J ₀ -B:GGAAGATCTAGAGGAACCAOCTTTGACSAOCTCGGTCCC
(3) V _H 5' sense primer
RSC λ 1:GGG0CCAGGG0CCGAGCTCGTGTGACTCAGTGGCCCTC
(4) V _H 3' Reverse Primer
RJ λ ₀ -B: GGAAGATCTAGAGGAACCAOCCOCTGTGACGGTCAGCTGGGTCCC
(5) V _H 5' Sense Primers
RSCVH1:GGTGGTTCTCTAGATCTTCCCAGTGGTGGAGGAGTCCRGG
RSCVH2:GGTGGTTCTCTAGATCTTCCCAGTGGTGAAGGAGTCCGAG
RSCVH3:GGTGGTTCTCTAGATCTTCCCAGTGGTGGAGGAGTCCGGG
RSCVH4:GGTGGTTCTCTAGATCTTCCCAGSAGCAGCTGRTGGAGTCCGG
(6) V _H 3' Reverse Primer
RSCG-B: CCTGG0CCGG0CTGGCCACTAGTACTGAYGGAGCCTTAGGTTGGCC
(7) Overlap Extension Primers
RSC-F(sense):GAGGAGGAGGAGGAGGAGG0CCG0CCAGGG0CCGAGCTC
RSC-B (reverse):GAGGAGGAGGAGGAGG0CCG0CCG0CCACTAGTG

[0035] 6. 兔抗体全套 VH 和 VL 基因的扩增与 scFv 片段的拼接

[0036] 按照 invitrogen 公司的 TRIZOLreagent 试剂盒提取脾脏中的总 RNA, 并使用 Fermentas 公司的 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA。然后以 cDNA 为模板, 分别克隆出兔抗体全套 VH 和 VL 基因。PCR 反应体系: 上游引物 2 μL, 下游引物 2 μL, cDNA 5 μL, 2×Taq PCR MasterMix 25 μL, 超纯水 16 μL。克隆反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并回收 VH 和 VL 目的片段。将所有回收的 VH 基因片段混合即得到 VH 基因库, 同样将回收的 V_K 和 V_λ 基因片段混合后即得到 VL 基因库。这两个基因库取等摩尔量为模板, 在 PCR 系统中进行重叠延伸, 即得到完整的 scFv 基因片段。PCR 反应体系: 上游引物 2 μL, 下游引物 2 μL, VH 基因库 3 μL, VL 基因库 2 μL, 2×Taq PCR MasterMix 25 μL, 超纯水 16 μL。克隆反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 25 个循环; 72℃ 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并用胶回收试剂盒回收 scFv 片段。

[0037] 7. 单链抗体库的构建

[0038] 将回收纯化的 scFv 基因产物经 sfiI 单酶切后克隆进入噬菌粒载体 pcomb 3, 连接产物电转化至大肠杆菌 XL1-Blue。取 2 μL 纯化的连接产物加入到 50 μL 电转化感受态中, 混匀后转入冰浴的电转化杯中, 在冰上放置 1 min, 后进行电转化。电转化条件: 电容 25 μF, 电阻 200W, 电压 2.5 kV, Expect t 约为 4.0 msec, 0.2 cm 电转化杯。电击后的细

胞立即倒入 1 mL 的 SOC 培养基中,再用 2 mL 的 SOC 洗涤,最终加入至 5 mL 的 SOC 培养基到空试管中,37°C 150 r/min 培养 1 h。转移至新试管中,并加入 10 mL 预热(37°C)的 LB 培养基中,并加入 10 μ L 的 100 mg/mL 的氨苄青霉素和 3 μ L 的 50 mg/mL 的四环素混匀。15mL 的菌液在 37°C 250 r/min,摇 2 h。用 LB 培养基将培养液稀释 10 倍和 100 倍,取 100 μ L 菌液稀释液涂布在 LB 平板上,根据长出的菌落计算库容。从抗体库平板上随机挑取 20 个菌落,分别加入 5 mL 的 LB 培养基中,37°C 250 r/min 培养过夜,碱裂解法提取质粒,进行 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 scFv 基因的重组率,根据重组率的结果判断抗体基因是否正确连到载体上,反应所建抗体库的质量。

[0039] 8. 噬菌体单链抗体库的富集筛选

[0040] 将转化后的菌液加入到 100mL LB 中,并加入 2 mL 的 VCSM13 噬菌体,在 37°C 300 rpm 摇 2 h,后加入卡那霉素,37°C 300 rpm 摇过夜;次日离心,上清液转移到 50mL 的离心管中,加入 4% PEG-8000,和 3% 氯化钠,沉淀上清中的重组噬菌体,用含 1% BSA 的 TBS 缓冲液重悬噬菌体,即为重组噬菌体表面展示抗体库。并用 0.2 μ m 的滤膜过滤到 2 mL 的离心管中,加入 0.02% (w/v) 的叠氮化钠,保存在 4°C 冰箱。

[0041] 以 20 μ g/mL 浓度的明胶-三聚氰胺偶联物包被酶标板,100 μ L/孔,4°C 过夜;次日,洗涤液洗涤 2 次,用 0.1% 的明胶封闭 1 h,倒掉封闭液,加入刚刚制备的噬菌体库稀释液 50 μ L/孔。加盖 37°C 恒温箱温育 2 h,倒掉噬菌液。每孔加入 150 μ L 的含 0.5% tween20 的 TBS,用枪吹洗 5 下,放置 5 min 倒掉洗涤液,重新洗一次(第一轮吹 5 下,第二轮 10 下,第三轮 15 下)。倒掉洗涤液,每孔加入 50 μ L 新配置的 10 mg/mL 胰蛋白酶。37°C 培养 30 min,将洗脱液移到 2 mL 的 XLI-Blue 培养液中。室温培养 15 min 后,取 2 μ L 的液体加入到 200 μ L 的 LB 培养基上,分别取 10 μ L 和 100 μ L 涂布在含有 Amp 的平板上。其余菌液加入 6 mL 的 LB 培养基,37°C 250 rpm,摇 2 h。加入 1mL 的 VCSM13 辅助噬菌体到 8mL 的培养液中,并转移至 100mL 的 LB 培养基中,300 rpm,摇 1.5-2 h,37°C。再加入 100 μ L 的 50 mg/mL 卡那霉素,300 rpm,37°C,过夜。进行第二轮筛选,如此“吸附-洗脱-扩增”的过程重复 4 轮。

[0042] 9. ELISA 法筛选阳性克隆

[0043] 从第 4 轮筛选的结果中,挑取 5 单菌落并经 VCSM13 辅助噬菌体拯救获得单个重组噬菌体。在酶标板上加抗原 50 μ L/孔,4°C 过夜;次日用封闭液封闭 1h,倒掉封闭液,加入噬菌体稀释液 50 μ L/孔,37°C 温浴 2 h,每个样品平行做两份,PBS 作为空白对照。倒去液体,用洗涤液洗涤 10 次,用封闭液稀释二抗 HRP-anti-HA (1:1000),每孔 50 μ L,37°C 温浴 1 h;每孔加 50 μ L 底物 TMB 反应,室温温育 15min 显色。每孔加入 50 μ L 终止液终止反应,酶标仪测定 OD₄₅₀ 吸光值。筛选出 OD₄₅₀ 值最高的克隆子 B4,送英韦创津公司测序。

[0044] 10. 单链抗体的可溶性表达及鉴定

[0045] 提取阳性克隆子 B4 质粒,通过热击法将质粒转入到 Rosseta 菌株中,挑取单菌落,接种到 5mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中,250rpm,37°C,培养过夜;取 5mL 培养液到 100 mL 的 LB 培养基中,250 rpm,37°C,摇 5-8 h,加入 IPTG 诱导,37°C,摇过夜。将培养的菌液 4000 r/min 离心 30 min,去除上清液;用含 1 mmol/L EDTA 的 20% 蔗糖溶液充分悬浮沉淀,冰上静置 10 min 后,9000 r/min,离心 10min,收集沉淀;加入 5mL 含 5 mmol/L MgSO₄ 的反渗透水中,冰上静置 15 min;9000 r/min,离心 10min,收集上清液,即为周质蛋白提取液;

用 Ni-NTA 亲和层析柱分离纯化 scFv 蛋白。SDS-PAGE 分析可溶性抗体蛋白的表达情况。

[0046] 11. 可溶性 B4-scFv 抗体的亲和力与交叉反应率分析

[0047] 通过间接竞争 ELISA 法分析 B4-scFv 抗体的亲和力。根据各浓度标准品溶液所得 OD₄₅₀ 的梯度变化,以抑制率 $(B/B_0) \times 100\%$ 为纵坐标(其中 B 为加入不同浓度的三聚氰胺标准溶液所测 OD 值, B₀ 为未加游离三聚氰胺所测 OD 值),三聚氰胺各标准溶液浓度为横坐标,绘制出三聚氰胺单抗的抑制曲线。以抑制率值接近 50% 所对应的三聚氰胺的浓度为 IC₅₀,用 IC₅₀ 表示单链抗体的亲和力。

[0048] 通过间接竞争 ELISA 法分析 B4-scFv 抗体的特异性。以三聚氰胺和氯霉素作为竞争物用于单抗的交叉反应性研究。以单链抗体对三聚氰胺的半数抑制浓度(IC₅₀)与单链抗体对竞争物的 IC₅₀ 之比的百分数为其交叉反应率(CR% = IC₅₀ 三聚氰胺 / IC₅₀ 三聚氰胺类似物 × 100%)。

[0049] 12. B4-scFv 检测牛奶中三聚氰胺含量

[0050] 用纯化的 B4-scFv 蛋白检测纯牛奶和奶粉中三聚氰胺的含量。首先,100 μL 的纯牛奶加入 900 μL 的磷酸盐缓冲液,往稀释后的溶液中加入三聚氰胺,分别配制三聚氰胺浓度为 2.0, 4.0, 和 8.0 mg/L 的纯牛奶样品。接着,称 1g 的奶粉溶于 5mL 的 0.02M 醋酸盐缓冲液中,3000rpm 离心 5min,取 100 μL 的上清液加入到 900 μL 的磷酸盐缓冲液中,分别配制三聚氰胺浓度为 2.5, 5.0, 和 10.0 mg/L 的奶粉样品。采用间接竞争 ELISA 法,通过回收率计算,分析 B4-scFv 的灵敏性。检测率(%) = (检测的量 / 预测的量) × 100。

[0051] 结果

[0052] 1. scFv 抗体库的富集和筛选

[0053] 富集与筛选是根据 ELISA 原理,将抗原包被在酶标板上,通过吸附-洗脱-扩增的过程,循环反复 4 轮,洗涤除去非特异性和亲和力低的噬菌体,洗脱下结合的噬菌体。每一轮筛选的结果如表 3,结果显示抗体库最初的库容量为 1.6×10^8 ,经过第一、二轮筛选后数目明显减少,第三、四轮数目逐渐上升,表明特异性单链抗体得到了富集。从第 4 轮筛选的结果中随机挑取 15 个单菌落培养,并经 VCSM13 辅助噬菌体拯救获得单个重组噬菌体。用 ELISA 法鉴定获得抗 MEL 的特异性单链抗体 B4-scFv。经 BLAST 搜索比对,B4-scFv 序列是日本大耳兔的抗体可变区基因序列。表 4 列出了 B4-scFv 的 CDR 和 FR 区。

[0054] 表 3 抗体库的富集筛选

[0055]

筛选轮数	加入的噬菌体 (pfu)	洗脱的噬菌体 (pfu)	洗脱/加入(%)
1	1.2×10^{12}	7.6×10^7	6.3×10^{-5}
2	1.2×10^{12}	9.2×10^7	7.7×10^{-5}
3	1.2×10^{12}	4.5×10^8	3.8×10^{-4}
4	1.2×10^{12}	5.3×10^8	4.4×10^{-4}

[0056]

表 4 B4-scFv 的氨基酸序列

[0057]

序列名称	轻链	重链
	FR1	
B4-scFv	Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ala	Gln Ser Val Glu Glu Ser Arg Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
	CDR1	
B4-scFv	Ser Gln Ser Ile Ser Thr Ala Leu Ala Trp Tyr	Ile Asp Leu Ser Ser Asn Ala
	FR2	
B4-scFv	Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile	Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile
	CDR2	
B4-scFv	Tyr Ala Ala Ser Lys Leu Ala Ser	Ile Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg
	FR3	
B4-scFv	Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Tyr	Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg
	CDR3	
B4-scFv	Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Asn Gly	Gly Arg Phe Ser Leu Trp Gly Pro
	FR4	
B4-scFv	Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0058] 2. B4-scFv 的可溶性表达

[0059] 选用 Rosseta 菌表达 B4-scFv, 经 IPTG 诱导表达。采用渗透休克法提取周质蛋白并用 Ni-NTA 亲和层析柱分离纯化 scFv 蛋白, SDS-PAGE 鉴定结果如图 1 所示, 结果显示 scFv 的分子量约 24KD。

[0060] 3. scFv 抗体的亲和力和交叉反应性分析

[0061] 纯化的 scFv 抗体采用间接竞争 ELISA 法(CI-ELISAs)测定其亲和力。B4-scFv 的标准抑制曲线如图 2, B4-scFv 的 IC₅₀ 为 9.6 μM。同样也采用 CI-ELISA 法测定 B4-scFv 的交叉反应性。选取三聚氰酸和氯霉素作为竞争物, 其结果如表 5。B4-scFv 对这两种三聚氰胺结构类似物的交叉反应性均小于 1%, 说明 B4-scFv 有较好的特异性。

[0062] 表 5 B4-scFv 抗体的交叉反应率

[0063]

药品名称	B4-scFv	
	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	交叉反应率(%)
Melamine	9.6	100
Cyanuric acid	4721.4	0.2
Chloromycetin	50938.9	0.02

[0064] 4. 牛奶样品中三聚氰胺的回收率

[0065] 配制含不同浓度三聚氰胺的纯牛奶和奶粉,采用间接竞争 ELISA 法分析 B4-scFv 的检测灵敏度。如表 6 所示, B4-scFv 的检测率范围在 90-108%,说明 B4-scFv 灵敏度较高,可用于检测食品、饲料中三聚氰胺的残留。

[0066] 表 6 B4-scFv 检测牛奶样品中的三聚氰胺

[0067]

样品	理论值	检测值	检测率 (%)
纯牛奶	2.0 mg /L	2.1 mg /L	105
	4.0 mg /L	4.3 mg /L	108
	8.0 mg /L	7.5 mg /L	94
奶粉	2.5 mg/kg	2.3 mg/kg	92
	5.0 mg/kg	4.5 mg/kg	90
	10 mg/kg	9.6 mg/kg	96

<110> 福州大学

<120> 一种抗三聚氰胺单链抗体及其应用

<160> 4

<210> 1

<211> 110

<212> PRT

<213> 日本大耳兔(*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 1

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Ala

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys

65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Tyr Gly Gly Tyr Ser Ser Ser

85 90 95

Asn Gly Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 2

<211> 110

<212> PRT

<213> 日本大耳兔(*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 2

Gln Ser Val Glu Glu Ser Arg Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asn Ala

20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

Ile Ile Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr

65 70 75 80

Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Val	Arg	Gly	Arg
				85					90					95	
Phe	Ser	Leu	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
				100				105						110	

<210> 3

<211> 330

<212> DNA

<213> 日本大耳兔(*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 3

gagctcgtga	tgaccagac	tccagcctct	gtggaggtag	ctgtgggagg	cacagtcacc	60
atcagttgcc	aggccagtea	gagcattage	actgcattag	cctggtatca	gcagaaacca	120
gggcagcctc	ccaagctect	gatctatget	gcatccaaac	tggeatctgg	gtcccatcg	180
cggttcaaag	gcagtggate	tgggacagag	tacactetca	ccatcagcgg	cgtggagtgt	240
gccgatgctg	ccacttacta	ctgtctatac	ggtggttata	gtagtagtaa	tggtggggct	300
ttcggcggag	gcaccaatgt	ggaaatcaaa				330

<210> 4

<211> 330

<212> DNA

<213> 日本大耳兔(*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 4

cagtcggtgg	aggagtccag	gggtegcctg	gtcacgcctg	ggacaccctt	gacactcacc	60
tgcacagtct	ctggaatgca	cctcagtagc	aatgcaatga	gctgggtccg	ccaggtcca	120
gggaaggggc	tggaatggat	cggaatcatt	gtagtagtg	gtagtacata	ctacgcgagc	180
tgggcgaaag	gccgattcac	catctccaaa	acctcgacca	cggtaggatct	gaaaatcacc	240
agtccgacaa	ccgaggacac	ggccacctat	ttctgtgtca	gggggaggtt	tagcctctgg	300
ggcccaggca	ccctggteac	cgtctectca				330

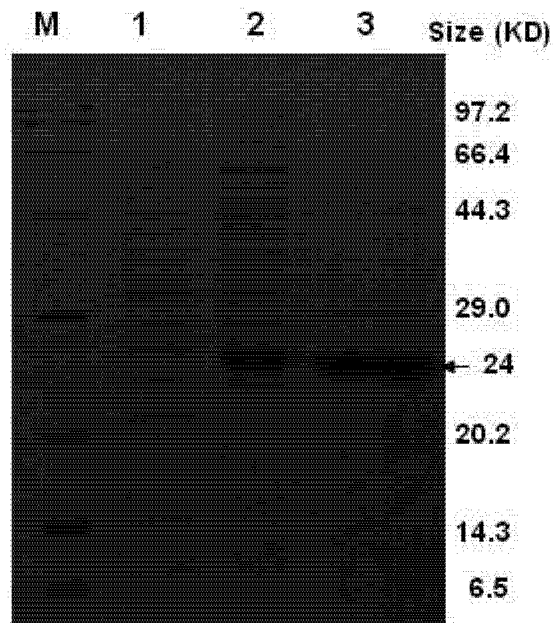


图 1

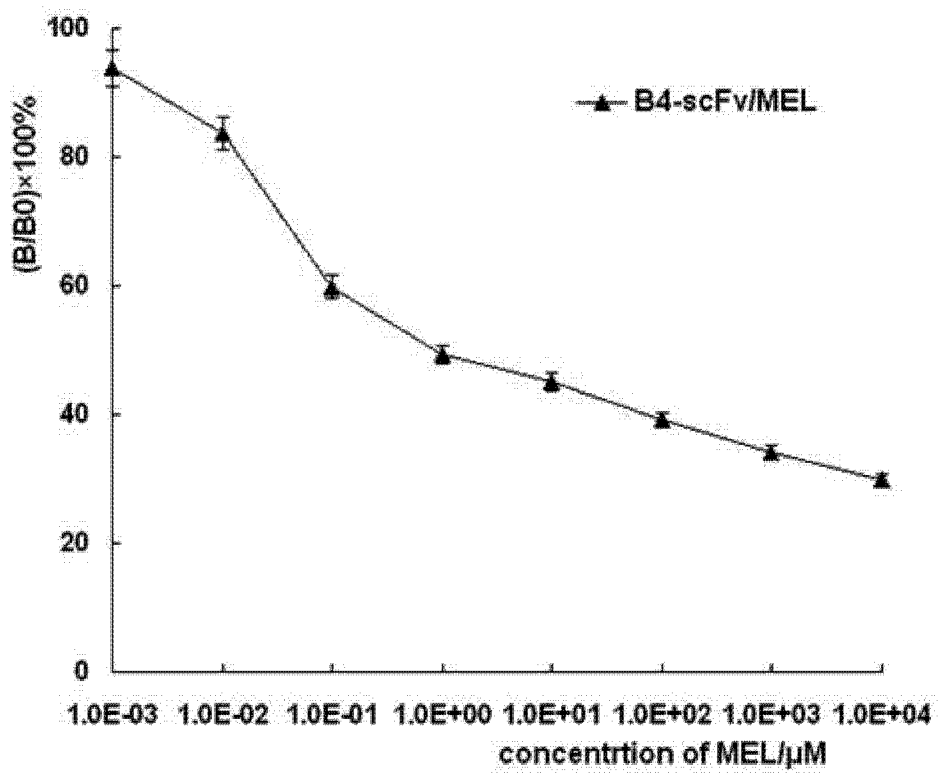


图 2

专利名称(译)	一种抗三聚氰胺单链抗体及其应用体		
公开(公告)号	CN102321177B	公开(公告)日	2013-05-01
申请号	CN201110285843.7	申请日	2011-09-23
[标]申请(专利权)人(译)	福州大学		
申请(专利权)人(译)	福州大学		
当前申请(专利权)人(译)	福州大学		
[标]发明人	吕瞰 黄爱玲		
发明人	吕瞰 黄爱玲		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/11 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53		
代理人(译)	蔡学俊		
审查员(译)	宋梦		
其他公开文献	CN102321177A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一条兔源抗三聚氰胺的单链抗体序列，其轻链可变区的氨基酸序列和重链可变区氨基酸序列如SEQIDNo.1和SEQIDNo.2所示。该抗体是利用噬菌体表面展示技术筛选获得。本发明的单链抗体特异性识别三聚氰胺，与含三聚氰胺的奶制品有明显的酶联免疫反应。可将本发明用于食品和饲料中三聚氰胺含量的检测。

