



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103992407 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 20

(21) 申请号 201310051416. 1

(22) 申请日 2013. 02. 17

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院卫
生学环境医学研究所

地址 300050 天津市和平区大理道一号

(72) 发明人 宁保安 彭媛 白家磊 高志贤
赵丽 孙思明

(51) Int. Cl.

C07K 16/44 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表1页 附图5页

(54) 发明名称

一种双酚 A 单链抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及双酚 A 单链抗体的筛选方法及其应用,属于生物技术领域,该单链抗体是由核糖体展示鼠源天然抗体库中筛选出来的并进行了功能性表达。本发明还涉及应用核糖体展示技术筛选双酚 A 的方法。本发明筛选出的双酚 A 单链抗体可以应用于污染检测与研制快速检测己烯雌酚残留的免疫速测试剂盒及治疗相关疾病中的用途。

1. 一种抗双酚 A 单链抗体,其特征在于可以特异识别小分子物质双酚 A。

2. 权利要求 1 抗双酚 A 单链抗体制备方法,由如下步骤组成:

(1) 抗双酚 A 单链抗体的筛选

将扩增得到的全文库经转录和翻译后,用于 BPA-OVA 或 BPA-BSA 作为半抗原固相交替筛选特异于 BPA 的单链抗体,每轮筛选的过程中都采用了复筛选法。筛选完成以后,调节 Mg^{2+} 浓度将筛选得到的单链抗体-核糖体-mRNA 三联体解离,得到相应的 mRNA,经过 RT-PCR 得到筛选后的 DNA 文库。得到的 DNA 文库与核糖体展示元件 T 启动子和 P 蛋白连接,构成筛选的全文库,再经体外转录、体外翻译、亲和筛、RT-PCR 扩增过程,反复筛选几轮后的到单链抗体的文库。经过五轮筛选后,得到的 mRNA 经紫外分光光度法测定,结果显示吸光度明显增加,且 RT-PCR 扩增得到的 DNA 条带亮度明显增加,说明筛选后的抗体文库中抗原阳性的抗体得到了富集。

Mg^{2+} 浓度根据筛选条件的严谨性不同进行调整。

(2) 抗双酚 A 单链抗体的功能性表达

筛选得到的单链抗体进行序列鉴定,挑选出无致死突变的克隆子,将单链抗体基因与 pTIG-TRX 连接成表达载体,在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达,经 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定,在 27.8KDa 处有目的蛋白条带,与理论蛋白大小一致,破碎后确定表达产物主要以包涵体的形式存在于沉淀中,需要对包涵体进行变复性获得有生物活性的单链抗体。

抗体的表达可以采用原核表达载体如 pBV220, pET 系列载体,优选 pTIG-TRX。

标签蛋白可以为麦芽糖结合蛋白、6× 组氨酸标签等,优选 6× 组氨酸标签。

(3) 抗双酚 A 单链抗体的鉴定

将阳性克隆子表达后的包涵体复性后使用间接 ELISA 和竞争间接 ELISA 法进行鉴定,结果筛选出两株克隆子对双酚 A 具有竞争结合活性,对其进行序列比对,结果表明 CDR 区有相似性。

3. 权利要求 2 中所述核糖体展示元件中的启动子根据体外翻译系统的不同可以为原核启动子 (T7 启动、tac 启动子等),优选原核启动子特别是 T7 启动子。

4. 权利要求 2 中所述筛选方法可以采用 BPA-BSA、BPA-OVA 进行固相筛选,并且在筛选的过程中采用了复筛选法,优选在不同筛选轮次中采用不同包被原交叉筛选。

5. 权利要求 2 中所述抗体的表达可以采用原核表达载体如 pBV220, pET 系列载体,并根据载体不同选择不同表达宿主,优选 pTIG-TRX 载体。

6. 权利要求 2 中所述标签蛋白可以为麦芽糖结合蛋白、6× 组氨酸标签等,优选 6× 组氨酸标签。

一种双酚 A 单链抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种双酚 A 单链抗体的筛选方法,属于生物技术领域,用于制备特异识别双酚 A 的高效抗体与研制可以快速检测双酚 A 残留的免疫速测试剂盒及治疗相关疾病的用途中。

背景技术

[0002] 双酚 A (Bisphenol A, 缩写为 BPA) 双酚 A 学名 2,2-二(4-羟基苯基)丙烷,简称二酚基丙烷。在 1891 年,俄罗斯化学家 A. P. Dianin 首次合成双酚 A,合成这种化合物时,是采用丙酮与两当量的苯酚在酸性介质中缩合而成。双酚 A 的应用十分广泛:不仅可以应用于化工领域生产,如:生产聚碳酸酯、环氧树脂、聚砜树脂、聚苯醚树脂、不饱和聚酯树脂等多种高分子材料和增塑剂、阻燃剂、抗氧剂、热稳定剂、橡胶防老剂、农药、涂料等精细化工产品;也可以用于日常生活用品的生产,例如:罐头食品和饮料的包装、奶瓶、水瓶、牙齿填充物所用的密封胶、眼镜片、收银小票和输水管道的内涂层等。19 世纪 30 年代中期,人们发现双酚 A 可以发挥雌激素作用。有科学家认为,长时间吸进双酚 A 粉末有害于肝功能及肾功能;特别严重的是它会降低血液中血红素的含量。而动物研究表明,双酚 A 可能导致很多疾病,包括生殖系统发育异常、女性提早性成熟、精子数量减少以及前列腺癌和乳腺癌等与激素相关的癌症、双酚 A 进入人体子宫内,可能导致后代的疾病变异,包括肥胖症、癌症和糖尿病。

[0003] 针对上述情况,发展检测双酚 A 残留的简便、快速、灵敏的方法是有效遏制滥用双酚 A 的重要手段和维护法规制度的必要保障。免疫学分析方法检测 BPA 具有快速简便的特点,而免疫分析方法检测需要有 BPA 的特异性抗体。但是 BPA 是小分子半抗原,免疫原性不强,通过传统的免疫动物的方法制备抗体较困难,制备的周期也较长。

[0004] 基因工程抗体单链抗体 (Single chain variable fragment, scFv) 具有低或无免疫原性、分子量小、组织穿透力强、成本低、可大规模生产等特点。目前,主要应用核糖体展示技术和噬菌体展示技术来筛选和制备单链抗体。核糖体展示技术是一种完全不依赖于细胞的体外展示技术,是在体外筛选和显示功能蛋白的方法,不需经过转化,文库容量远大于噬菌体单链抗体文库。此外核糖体展示技术还具有建库和筛选方法简便,便于引入突变和重组技术如寡核苷酸定点突变,倾向错误 PCR, DNA shuffling 等,提高了靶标蛋白的亲合力;基因突变与表型筛选都在体外进行,简化了操作步骤。天然抗体库的抗体基因来源于未经免疫的动物或人体的 B 细胞,从理论上讲,能够代表所有初级 B 细胞含有的抗体基因的多样性,使用任何抗原都可能从中筛选到相应的抗体,具有较强的通用性。利用核糖体展示技术筛选针对小分子半抗原抗体的研究较少,尤其是从天然抗体文库中筛选更为少见。

发明内容

[0005] 本发明的主要目的是提供一种潜在的检测和医学用抗双酚 A 单链抗体。

[0006] 本发明的第二个目的提供一种抗双酚 A 单链抗体的制备方法。

[0007] 本发明的第三个目的提供抗双酚 A 单链抗体在制备检测试剂盒中的用途。

[0008] 本发明的技术方案概述如下：

[0009] 本发明提供的抗双酚 A 单链抗体是从核糖体展示鼠源天然单链抗体库中筛选获得的并进行了功能性表达。

[0010] 本发明提供的抗双酚 A 单链抗体的制备方法为：

[0011] 1 核糖体鼠源天然单链抗体文库 scFv 的扩增

[0012] 全文库由本实验室孙亚楠构建。所构建的抗体文库是从未免疫的 6-8 周龄的小鼠中获得总 mRNA，然后经反转和扩增后获得 VH 和 VL。(G4S)3linker 通过 SOE 法连接 VH 和 VL，构建成单链抗体文库，大小约为 750bp。经过测序及序列比对，所构建的文库多样性好，可用于单链抗体的筛选。

[0013] 扩增出大小为 102bp 核糖体展示元件 T(包括 T7 启动子,5' 茎环,核糖体结合位点)和大小为 298bp 间隔序列 P(噬菌体 P 蛋白部分序列),含 3' 茎环,作为间隔序列,分别经序列测定,与理论序列完全一致。以重叠引物延伸法(splicing by overlap extension, SOE)将 T 片段与 scfv 文库连接,再将 P 片段与其拼接,构建成核糖体展示单链抗体文库,大小为 1200bp 左右。

[0014] 其中核糖体展示元件中的启动子根据体外翻译系统的不同可以为原核启动子(T7 启动、tac 启动子等),本发明优选原核启动子特别是 T7 启动子。

[0015] 2 抗双酚 A 单链抗体的筛选

[0016] 将扩增得到的全文库经转录和翻译后,用于 BPA-OVA 或 BPA-BSA 作为半抗原固相交替筛选特异于 BPA 的单链抗体,每轮筛选的过程中都采用了复筛选法。筛选完成以后,调节 Mg²⁺ 浓度将筛选得到的单链抗体-核糖体-mRNA 三联体解离,得到相应的 mRNA,经过 RT-PCR 得到筛选后的 DNA 文库。得到的 DNA 文库与核糖体展示元件 T 启动子和 P 蛋白连接,构成筛选的全文库,再经体外转录、体外翻译、亲和筛、RT-PCR 扩增过程,反复筛选几轮后的到单链抗体的文库。经过五轮筛选后,得到的 mRNA 经紫外分光光度法测定,结果显示吸光度明显增加,且 RT-PCR 扩增得到的 DNA 条带亮度明显增加,说明筛选后的抗体文库中抗原阳性的抗体得到了富集。

[0017] Mg²⁺ 浓度根据筛选条件的严谨性不同进行调整。

[0018] 3 抗双酚 A 单链抗体的功能性表达

[0019] 筛选得到的单链抗体进行序列鉴定,挑选出无致死突变的克隆子,将单链抗体基因与 pTIG-TRX 连接成表达载体,在大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达,经 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定,在 27.8KDa 处有目的蛋白条带,与理论蛋白大小一致,破碎后确定表达产物主要以包涵体的形式存在于沉淀中,需要对包涵体进行变复性获得有生物活性的单链抗体。

[0020] 抗体的表达可以采用原核表达载体如 pBV220, pET 系列载体,优选 pTIG-TRX。

[0021] 标签蛋白可以为麦芽糖结合蛋白、6× 组氨酸标签等,优选 6× 组氨酸标签。

[0022] 4 抗双酚 A 单链抗体的鉴定

[0023] 将阳性克隆子表达后的包涵体复性后使用间接 ELISA 和竞争间接 ELISA 法进行鉴定,结果筛选出两株克隆子对双酚 A 具有竞争结合活性,对其进行序列比对,结果表明 CDR 区有相似性。

[0024] 本发明还可以提供一种测定环境和食品中双酚 A 残留的检测试剂盒中的最关键

检测试剂——抗体,尽管双酚A对健康有害已经是一个不言自明的结论,政府立即禁止双酚A的使用似乎是理所当然的事情,但事实并非如此。目前含双酚A的塑料容器,在世界上包括中国在内的绝大多数国家都在正常使用。针对上述情况,发展检测双酚A残留的简便、快速、灵敏的方法是非常必要的,本发明制备的双酚A单链抗体可以部分取代测定食品和环境样品中双酚A残留测定所需试剂。

附图说明

- [0025] 图1核糖体展示抗体库全长DNA电泳图。
- [0026] M:分子量标准 Marker 1-2:核糖体展示抗体库库DNA
- [0027] 图2筛选后五轮的紫外下mRNA吸光度
- [0028] 1-5:筛选次数
- [0029] 图3五轮的RT-PCR产物图
- [0030] M:分子量标准 Marker 1:阴性 2:第5轮筛选后的DNA
- [0031] 3:第4轮筛选后的DNA 4:第3轮筛选后的DNA
- [0032] 5:第2轮筛选后的DNA 6:第1轮筛选后的DNA
- [0033] 图4PCR鉴定第五轮筛选后酶切图(A)及RT-PCR产物的阳性克隆子(B)
- [0034] M:分子量的标准 Marker 1-3:4轮筛选后的DNA酶切图 4:空质粒阴性对照
- [0035] 5-9:5轮筛选后的菌落PCR得到的DNA 10 阴性对照
- [0036] 图5SDS-PAGE分析表达的单链抗体的上清(A)和沉淀(B)
- [0037] M:分子量标准 Marker 1:空质粒阴性对照 2:上清 3:包涵体沉淀
- [0038] 图6五轮筛选后经测序得到序列正确的克隆子表达的包涵体变复性后ELISA测定单链抗体活性
- [0039] 图7单链抗体竞争结合BPA的竞争ELISA分析。

具体实施方式

[0040] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试剂与材料,如无特殊说明,均可从常规试剂公司购买得到。

- [0041] 实施例1核糖体展示鼠源单链抗体文库的构建
- [0042] 一抗体文库的扩增
- [0043] 1PCR的引物
- [0044] VH/for 扩增单链抗体 scFv 上游引物:
- [0045] VH/for5' TATATCCATGGCCCAGGTSMARCTGCAG3'
- [0046] VL/back 扩增单链抗体下游引物:
- [0047] VL/back5' CGCG GTTGC GGTC CG TTT BAK YTC CAR CTT KGT SCC3'
- [0048] T7/for 扩增全文库上游引物:
- [0049] T7/for5' CGCATACGAAATTAATACGACTCAC3'
- [0050] PDRS/back 扩增全文库下游引物
- [0051] PDRS/back5' CCGCACACCAGTAAGGTG3'

[0052] 2 核糖体展示全文库的扩增

	PCR 反应体系组分	用量
[0053]	Pfu PCR mix	12.5 μ L
	DNA模板	1 μ L
	引物T7/for	1 μ L
	引物PDRS/back	1 μ L
	dd H ₂ O	9.5 μ L
	Total	25 μ L

[0054] 反应条件:94℃预变性 5min;94℃变性 30s;65℃退火 30s;72℃延伸 2min10s;10cycles;94℃变性 30s;55℃退火 30s;72℃延伸 2min10s;20cycles,72℃延伸 7min;4℃保存。1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物,胶回收目的片段。

[0055] 3 核糖体展示单链抗体库的扩增

	PCR 反应体系组分	用量
[0056]	Pfu PCR mix	12.5 μ L
	DNA模板	2 μ L
	引物VH/for	1 μ L
	引物VL/back	1 μ L
	dd H ₂ O	7.5 μ L
	Total	25 μ L

[0057] 反应条件:94℃预变性 5min;94℃变性 30s;60℃退火 30s;72℃延伸 1min40s;30cycles;72℃延伸 7min;4℃保存。1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物,胶回收目的片段。

[0058] 实施例 2

[0059] 一固相亲和筛选

[0060] 这一步骤中所有的试剂瓶、试剂以及酶标板都要用 DEPC 水处理,以保证没有 RNase 污染。

[0061] (1) 包被筛选孔:包被原 BPA-BSA、BSA 或 BPA-OVA、OVA 用无菌的碳酸盐缓冲液稀释至 10 μ g/mL,在酶标板上每孔加入 100 μ L,于 4℃包被过夜;

[0062] (2) 倾去包被液,用灭菌 PBS 洗涤封闭孔 3 次,每次 3min;筛选孔加 200 μ L 封闭液(PBS+0.5% BSA),封闭 1h,倒掉封闭液,PBS 洗 2 次,每次 2min;然后用冷的 WBT 洗涤两次,每次 3min。最后,用冷的 WBT 注满筛选孔,冰上放置至少 20min;

[0063] (3) 取冰上放置的翻译产物(采用 promega Escherichia coli(E.coli) S30Extract System 体外翻译)转移到准备好的含 BSA 或 OVA 的筛选孔中,在冰室中轻轻振摇 1 小时。使体外翻译产物和固相 BPA 或 OVA 充分结合,捕获能和 BSA 或 OVA 结合的 scFv-核糖体-mRNA 复合物;再将反应产物加到包被原是 BPA-BSA 或 BPA-OVA 的筛选孔中,冰室中轻摇 1h,捕获 scFv-核糖体-mRNA 复合物;

[0064] (4) 倾去孔中残液,以冰预冷的 WBT 洗 3 次,每次 1min。

[0065] (5) 向孔中加入 100 μ l 冰预冷的洗脱缓冲液缓冲液 EB (含有 5U 的 RNasin inhibitor), 继续冰上轻轻振摇 10min, 使核糖体大小亚基分离, 释放 mRNA。

[0066] (6) 重复 5 步骤。

[0067] (7) 将两次洗脱液都加入 Dnase I, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min, 以去除 DNA 模板。将得到的 mRNA 液氮保存或立即纯化。

[0068] 二模板的重新构建与下一轮筛选

[0069] (1) 采用 Qiagen 公司的 RNeasy clean up kit 纯化筛选得到的 mRNA, 用 M-MLV First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA), 进行反转录, 并进一步 PCR 扩增获得 scFv 文库, 并与 T, P 片段依次偶联, 构建下一轮完整的核糖体展示文库。

[0070] 将五筛选后得到的 RT-PCR 产物分别连接到克隆载体 pMD18-T 上, 转化到大肠杆菌中, 随机挑选阳性克隆子进行测序鉴定。测序结果可知在五轮筛选后, 测序结果显示文库序列发生了出现了较高的相似性。证明特异性的序列高度富集。

[0071] 实施例 3 单链抗体的表达及性质鉴定

[0072] 一. 抗双酚 A 单链抗体的功能表达

[0073] 1. 筛选后单链抗体基因的扩增

[0074] 将经测序翻译完全正确的单链抗体基因用重新设计的含有酶切位点的引物扩增。从 pMD18-T-scFv 克隆载体上扩增得到带有酶切位点的 scFv 基因。引物 SF-Trx-EcoRI 和 SR-XhoI-1 分别含有 EcoRI、XhoI 酶切位点。

[0075] SF-Trx-EcoRI (引入 EcoI 酶切位点): CGCGAATTCTAAATGGCCCAGGT

[0076] SR-XhoI-1 (引入 XhoI 酶切位点): AATCTACTCGAGCGCGTTGCGGTCCGTTT

	PCR 反应体系组分	用量
	Pfu PCR mix	12.5 μ L
	质粒模板	1.0 μ L
[0077]	引物 SF-Trx-EcoRI	1.0 μ L
	引物 SR-XhoI-1	1.0 μ L
	dd H ₂ O	9.5 μ L
	Total	25.0 μ L

[0078] 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s; 56 $^{\circ}$ C 退火 30s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min20s; 10cycles; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s; 50 $^{\circ}$ C 退火 30s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min20s; 20cycles; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min; 4 $^{\circ}$ C 保存。1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物, 胶回收目的片段。

[0079] 2. 重组 scFv 原核表达质粒构建:

[0080] 用 EcoRI、XhoI 双酶切质粒 pTIG-TRX。酶切体系 50 μ L: EcoRI 2.5 μ L, XhoI 2.5 μ L, 10 $\times$ buffer 5 μ L, dd H₂O 10 μ L; 质粒 pTIG-TRX 30 μ L。37 $^{\circ}$ C 过夜酶切。1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 将 EcoRI、XhoI 双酶切纯化的 scFv 片段和同样酶切的质粒 pTIG-TRX 用 T4DNA 连接酶连接, 连接体系: pTIG-TRX 1 μ L, scFv 3 μ L, dd H₂O 4 μ L, 混匀后 45 $^{\circ}$ C 温浴 5min, 立即放入 0 $^{\circ}$ C。再加入 T4 连接酶 (Takara) 1 μ L, 10 $\times$ buffer 1 μ L, 16 $^{\circ}$ C 连接 3h。转化宿主菌 BL21 (DE3)。

[0081] 3. 单链抗体蛋白的诱导表达

[0082] 将步骤二鉴定的阳性菌落接种于 5ml 含 Amp 的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C, 200r/min 振

荡培养过夜,次日将过夜培养的菌液按 1 : 100 的比例重新转接于 5mL 含 Amp 的 LB 液体培养基,并设阴性对照,30℃振荡培养至 A600 约为 0.6-0.8,加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,然后继续振荡培养,诱导 4h。离心收集菌体,用 PBS50mL 吹打离心后菌体,用超声细胞破碎机进行破碎至菌液清亮,于冷冻离心机离心后,10000r/min 离心 20min,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE,目的表达产物抗 BPA 单链抗体主要在沉淀中存在。

[0083] 二. 抗双酚 A 单链抗体的鉴定

[0084] 1. 单链抗体结合活性的检测

[0085] 将测序完全正确的单链抗体用于大肠杆菌的表达,表达后形成的包涵体进行变复性,然后通过间接 ELISA 的测定,筛选出与 BPA 有结合活性的表达菌株。使用 BPA-OVA 包被酶联孔,并同时包被相同浓度的 OVA,将单链抗体稀释 5 个梯度作为一抗溶液,抗 his 的鼠单克隆抗体作为二抗,羊抗鼠 -HRP 作为酶标二抗,TMB 显色,2mol/L 的 H_2SO_4 终止后,酶标仪测定 450nm 处的吸光值,将 BPA-OVA 的值减去 OVA 的值作为单链抗体与 BPA 结合的吸光值。如图 6 所示,为单链抗体与 BPA 结合的吸光值的柱形图,以空质粒的表达上清为对照。

[0086] 2. 筛选后单链抗体的竞争活性的检测

[0087] 变复性后的包涵体先进行间接 ELISA 测定,然后进行竞争 ELISA 分析,以 BPA-OVA 为包被抗原,用 10% 的甲醇溶液稀释 BPA 可溶性半抗原作为竞争小分子,浓度为 10-2000ng/ml。经竞争 ELISA 分析,可知其有明显的 OD 值的变化。

[0088] 3. 单链抗体的纯化

[0089] 经过竞争 ELISA 分析,将具有能与 BPA 特异结合的单链抗体进行变复性研究,探索适宜的复性条件。

[0001]

序列-赵丽

基因序列

ATGGCCCAGGTCAAACCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTATGTTGCGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTC
TGGCTACACCTTCACCGATCATTATATGTACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGACTGGATTGGATGCATTA
ATCCTGGAAATACTGGTTCCCGGTACAATCAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACTTCCTCCAGCACA
GCATACATTCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACTAGGTGCTGGGGCCAAGGCACCAC
GGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTTCAGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCTGACATCGAGCTCACTCAGT
CTCCAGCATCTTGTTCAGCATCTCTGGGGCAAAAAGGTCTCGATCCGCTGCCGTGCCAGCCAAAACGTAAGTTACATGTAC
TGGTACCAGCAGCGTTCAGATGCCTCCCCCAAAACGGTGGATTTATGGCGCGTCCAACTCGATATTCGGGAGTCCCTGCTCG
CTTCGACGGCAGTTGCTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCATTTATTACT
GCCAGCAGTGGTCCAATAACCCACCCACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGACCGCAACCGGGACAAAG
CTGGAAC TCAAACGGACCGCAACCGCG

氨基酸

MAQVKLQQSGAELVCCGASVKLSCKASGYTFTDHYMYWVKRPGQLDWIGCINPGNTGSRYNQKFKSKATLTVDTSSST
AYIQLSSLTSEDSAVYYCTRXXXXXXXXXXWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIELTQSPASCSASLGQKVSIRCRAS
QXXNVSYMYWYQQRSDASPKRWIYGASNSIFGVPARFDGSCSGTSYSLTISSMEAEDAAIYYCQWSNNPPTFGGGTKLE
IKRTATGTKLELKRTATA

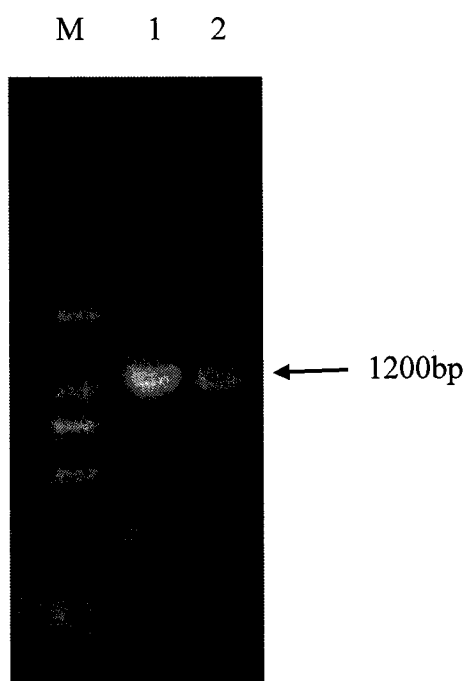


图 1

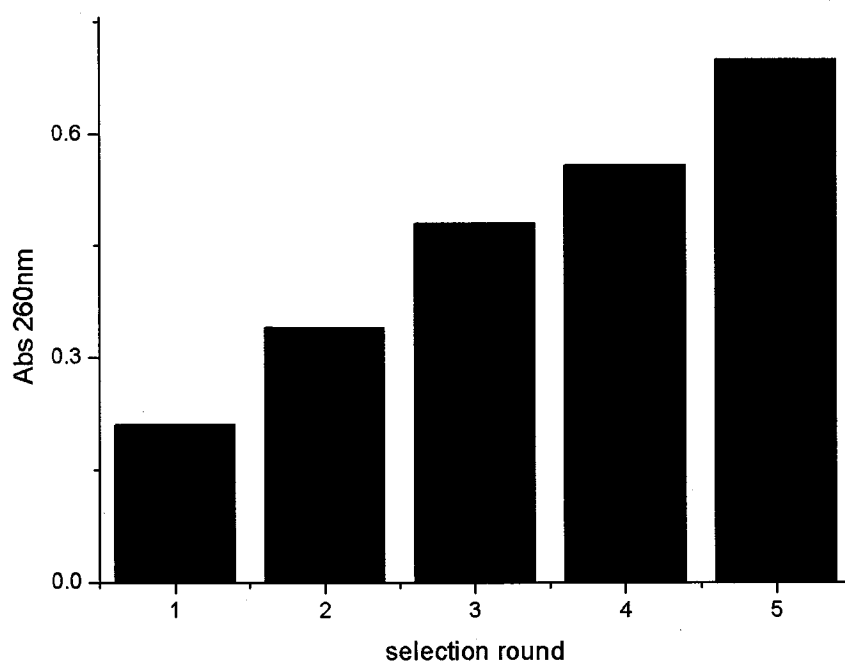


图 2

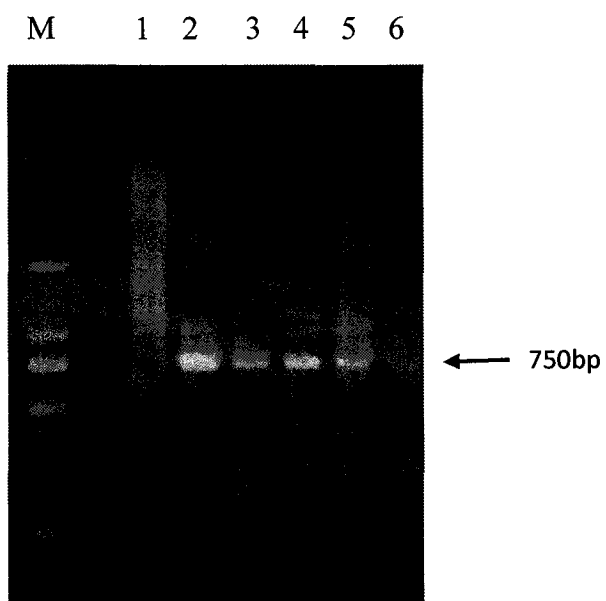


图 3

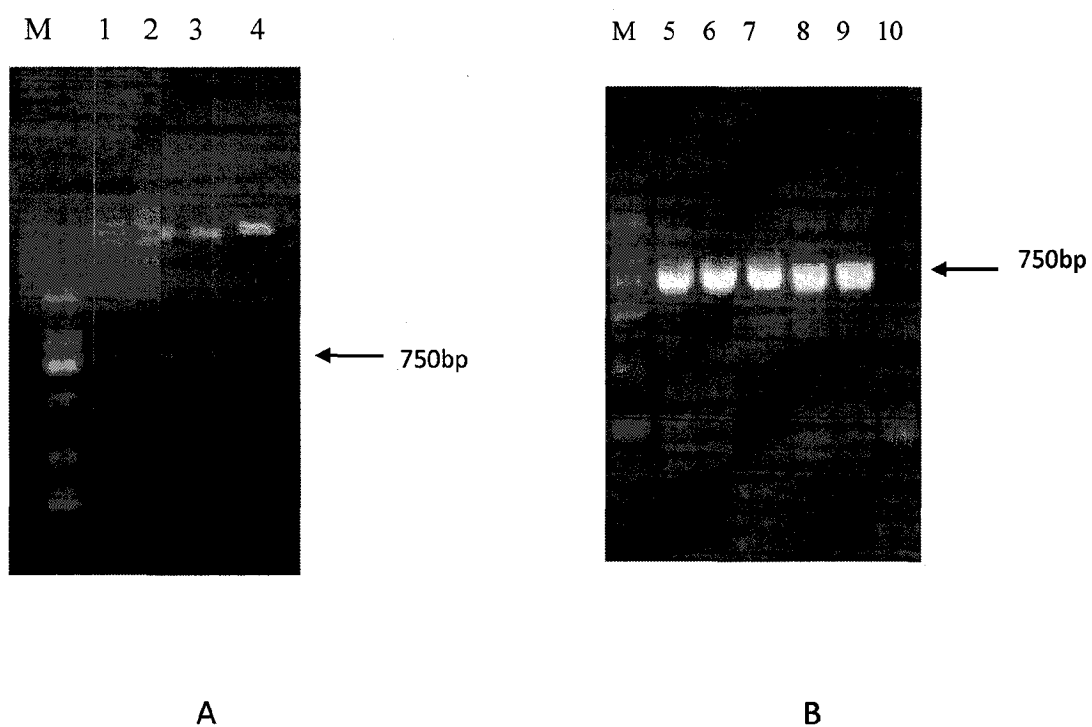


图 4

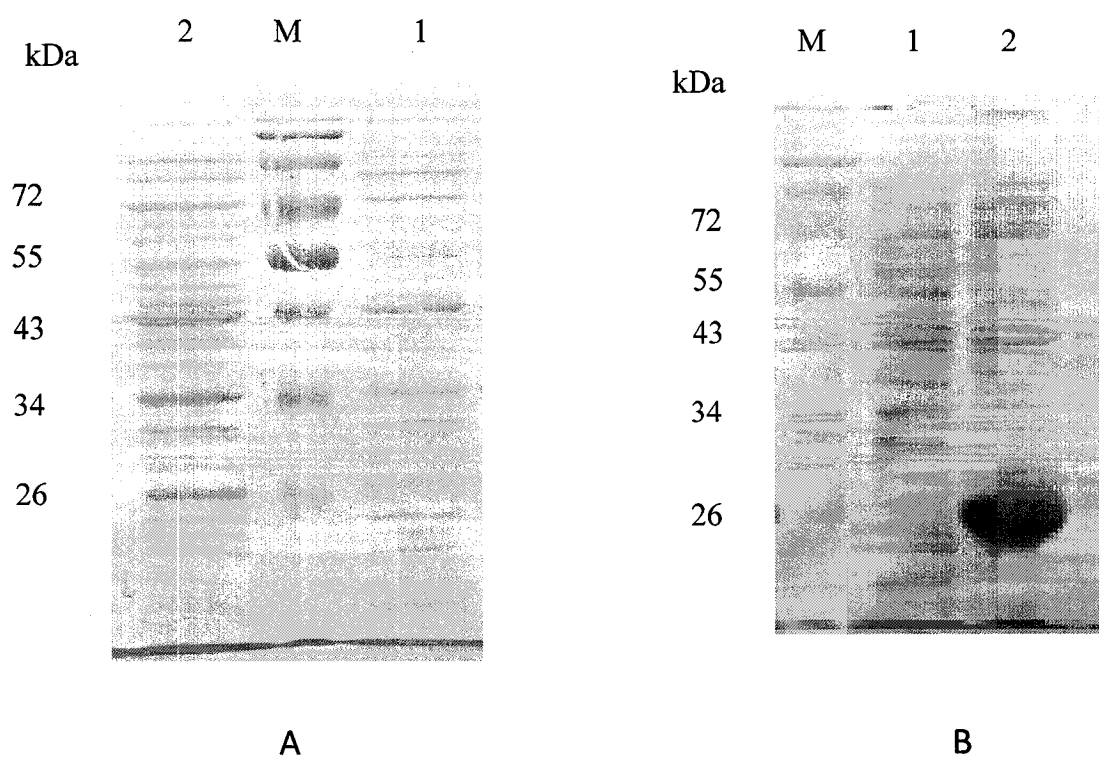


图 5

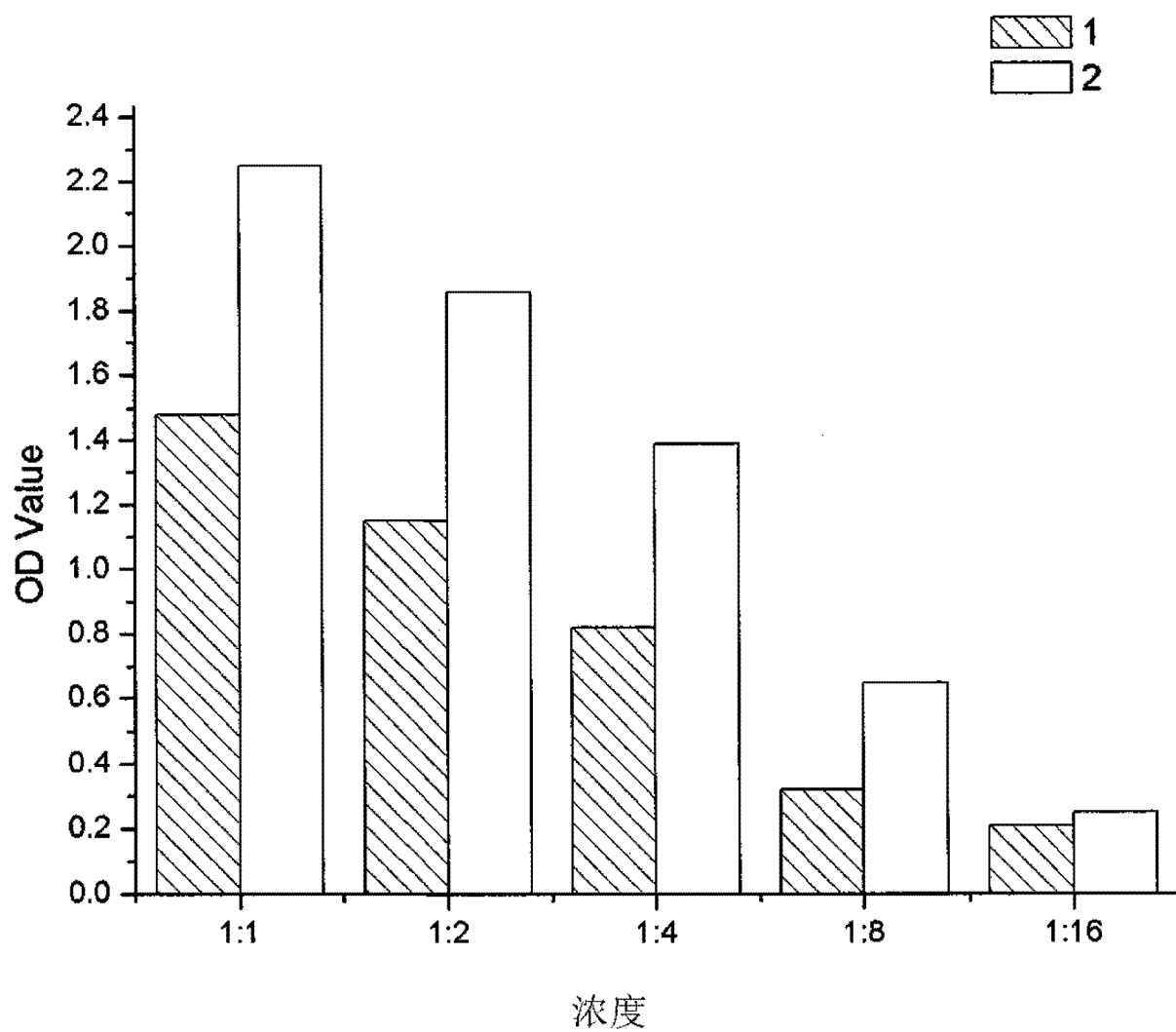


图 6

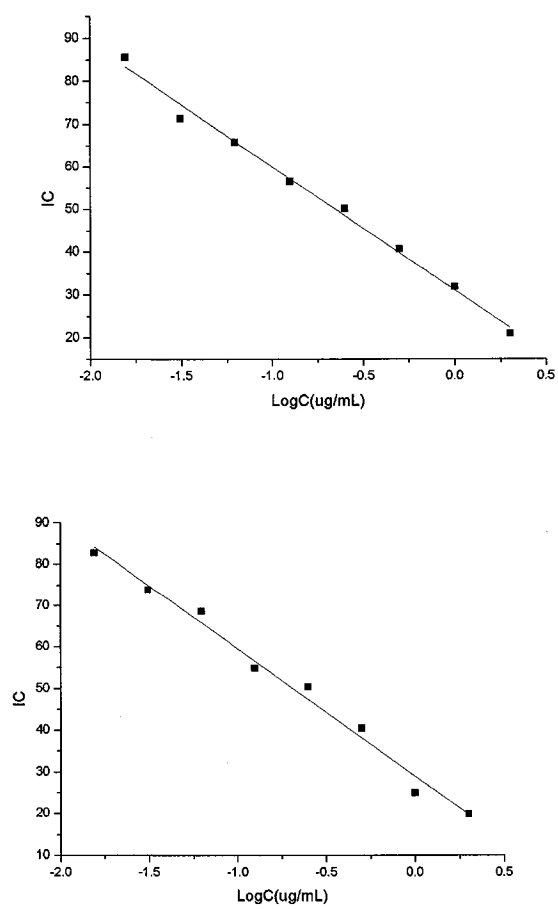


图 7

专利名称(译)	一种双酚A单链抗体及其用途		
公开(公告)号	CN103992407A	公开(公告)日	2014-08-20
申请号	CN201310051416.1	申请日	2013-02-17
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
[标]发明人	宁保安 彭媛 白家磊 高志贤 赵丽 孙思明		
发明人	宁保安 彭媛 白家磊 高志贤 赵丽 孙思明		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及双酚A单链抗体的筛选方法及其应用，属于生物技术领域，该单链抗体是由核糖体展示鼠源天然抗体库中筛选出来的并进行了功能性表达。本发明还涉及应用核糖体展示技术筛选双酚A的方法。本发明筛选出的双酚A单链抗体可以应用于污染检测与研制快速检测己烯雌酚残留的免疫速测试剂盒及治疗相关疾病中的用途。

