



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110950961 A

(43)申请公布日 2020.04.03

(21)申请号 201911268156.7

(22)申请日 2019.12.11

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 沈建忠 王战辉 于雪芝 温凯
江海洋 杨慧娟 张素霞 史为民
郭柳川

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 黄爽

(51)Int.Cl.

C07K 16/44(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

溴敌隆纳米抗体及其应用

(57)摘要

本发明提供一种溴敌隆纳米抗体及其应用。本发明利用溴敌隆半抗原及其人工抗原免疫动物后能够产生高效价、高亲和力和特异性强的淋巴细胞,分离B淋巴细胞后,提取其RNA,构建纳米抗体文库,筛选高灵敏度的纳米抗体。可特异性结合溴敌隆的纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。该抗体的IC₅₀值为1.9ng/mL,线性检测范围为0.54-7.21ng/mL。该抗体具有结构简单、耐高温、耐酸碱以及易于生产等特性,对于溴敌隆的低成本、大批量样品的溴敌隆残留现场检测具有重要意义。

1. 溴敌隆纳米抗体,其特征在于,所述抗体包含如下的氨基酸序列或由其组成:
 - i) SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;或
 - ii) 在i)的N端和/或C端连接标签得到的氨基酸序列;或
 - iii) i)或ii)的氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸得到的具有相同功能的抗体。
2. 编码权利要求1所述抗体的核酸分子。
3. 含有权利要求2所述核酸分子的生物材料,所述生物材料为重组DNA、表达盒、转座子、质粒载体、噬菌体载体、病毒载体、工程菌或转基因细胞系。
4. 溴敌隆检测试剂或试剂盒,其特征在于,有效成分为权利要求1所述抗体。
5. 一种适用于溴敌隆残留分析的ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括盒体、设在盒体内可拆卸的酶标板以及设在盒体内的试剂;所述酶标板的每个孔包被有溴敌隆人工抗原,所述试剂包括权利要求1所述抗体,以及溴敌隆标准溶液、酶标二抗、缓冲液PBS、洗涤液PBST、显色液和反应终止液中的至少一种。
6. 权利要求1所述抗体的以下任一应用:
 - 1) 用于溴敌隆检测;
 - 2) 用于制备溴敌隆检测试剂或试剂盒;
 - 3) 用于溴敌隆的富集和纯化;
 - 4) 用于制备溴敌隆的富集和纯化试剂。

溴敌隆纳米抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体地说,涉及一种溴敌隆纳米抗体及其应用。

背景技术

[0002] 溴敌隆(bromadiolone, BRD)是一种适口性好、毒性大、靶谱广的高效杀鼠剂。它不但具备敌鼠钠盐、杀鼠醚等第一代抗凝血剂作用缓慢、不易引起鼠类惊觉、容易全歼害鼠的特点,而且还具有急性毒性强的突出优点,单剂量使用对各种鼠都能有效地防除。动物取食中毒死亡的老鼠后,会引起二次中毒。对鱼类、水生昆虫等水生生物有中等毒性。近年来,随着此类灭鼠剂取代毒鼠强、氟乙酰胺等急性灭鼠药的广泛应用,常会发生误食事件。而溴敌隆中毒的快速诊断是减少人员伤亡的关键,因此,开发稳定、快速、高灵敏、高通量的溴敌隆检测方法,对于保障我国食品安全、减少由此带来的人员伤亡具有重要意义。

[0003] 免疫分析法由于简单快速、价格低廉、无需专业技术人员、适用于现场大量样品的快速筛选等优点,在有害化合物快速检测领域广泛应用。免疫分析法中,作为核心试剂的抗体,决定着分析方法的灵敏度、特异性和稳定性。常规的IgG抗体由两条重链和两条轻链组成,具有结构复杂、稳定性差、生产成本低、不易进行体外改造等缺点,极大地限制了其在实际样本检测中的应用。在骆驼科动物体内存在天然缺失轻链的重链抗体(heavy chain antibody, HCAb)。通过基因工程技术可以获得保留抗原结合活性的HCAb的重链可变区(variable domain of the heavy chain of HCAbs, VHH),称为单域抗体(single domain antibody, sdAb)。由于sdAb的尺寸处于纳米级别,故又称之为纳米抗体(nanobody, Nb)。纳米抗体耐受性强、结构简单、易于体外进化、生产成本低等特性弥补了传统抗体的不足,对于溴敌隆的免疫学检测方法有重要的实用价值。因此亟需开发新的用于检测溴敌隆的纳米抗体。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种溴敌隆纳米抗体及其应用。

[0005] 为了实现本发明目的,发明人利用噬菌体展示技术,从溴敌隆免疫羊驼的外周血中分离淋巴细胞,提取RNA,构建溴敌隆纳米抗体库,并从抗体库中筛选获得了一种分子量小、稳定性强、易克隆表达、可特异性结合溴敌隆的纳米抗体。

[0006] 第一方面,本发明提供一种溴敌隆纳米抗体,所述抗体包含如下的氨基酸序列或由其组成:

[0007] i) SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;或

[0008] ii) 在i)的N端和/或C端连接标签得到的氨基酸序列;或

[0009] iii) i)或ii)的氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸得到的具有相同功能的抗体。

[0010] 所述溴敌隆纳米抗体的结构分析如图3所示,其氨基酸序列的结构域包括四个框架区(Framework region, FR)和三个互补决定区(Complementarity-determining region,

CDR)。

[0011] 第二方面,本发明提供编码所述溴敌隆纳米抗体的核酸分子。

[0012] 优选地,所述核酸分子的序列如SEQ ID NO:2所示。

[0013] 本发明提供的核酸分子或者至少部分序列可以通过合适的表达系统进行表达以得到相应的蛋白质或多肽。这些表达系统包括但不限于细菌,酵母菌,丝状真菌,动物细胞,昆虫细胞,植物细胞或无细胞表达系统。

[0014] 进一步地,本发明提供一种载体,包含所述核酸分子。由于遗传密码子具有简并性,该核酸分子可以根据不同的应用目的而不同。

[0015] 进一步地,本发明提供一种宿主细胞,所述宿主细胞包含所述蛋白质或表达载体。

[0016] 第三方面,本发明提供含有上述核酸分子的生物材料,所述生物材料包括但不限于重组DNA、表达盒、转座子、质粒载体、噬菌体载体、病毒载体、工程菌或转基因细胞系。

[0017] 第四方面,本发明提供一种溴敌隆检测试剂或试剂盒,有效成分为SEQ ID NO:1所示的溴敌隆纳米抗体。

[0018] 第五方面,本发明提供一种适用于溴敌隆残留分析的ELISA检测试剂盒,所述试剂盒包括盒体、设在盒体内可拆卸的酶标板以及设在盒体内的试剂;所述酶标板的每个孔包被有溴敌隆人工抗原,所述试剂包括SEQ ID NO:1所示的抗体,以及溴敌隆标准溶液、酶标二抗、缓冲液PBS、洗涤液PBST、显色液和反应终止液等中的至少一种。

[0019] 第六方面,本发明提供所述溴敌隆纳米抗体的以下任一应用:

[0020] 1) 用于溴敌隆检测;

[0021] 2) 用于制备溴敌隆检测试剂或试剂盒;

[0022] 3) 用于溴敌隆的富集和纯化;

[0023] 4) 用于制备溴敌隆的富集和纯化试剂。

[0024] 本发明还提供基于所述溴敌隆纳米抗体与溴敌隆特异性结合的能力,建立的一种溴敌隆的检测方法。优选地,所述方法包括酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA),化学发光免疫分析法(Chemiluminescence immunoassay,CLIA),荧光免疫法(Fluoroimmunoassay,FIA),免疫芯片法,亲和层析法和免疫层析法等。

[0025] 进一步地,可以将SEQ ID NO:1所示的溴敌隆纳米抗体作为前体,通过随机或定点突变技术进行改造,能够获得性质(水溶性、稳定性、亲和力以及特异性等)更好的突变体,这些突变体均属于本发明保护范围。

[0026] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0027] 利用本发明提供的溴敌隆纳米抗体能够准确灵敏地检测样品中的溴敌隆残留,该抗体的 IC_{50} 值为1.9ng/mL,线性检测范围为0.54-7.21ng/mL。该抗体具有结构简单、耐高温、耐酸碱以及易于生产等特性,对于溴敌隆的低成本、大批量样品的溴敌隆残留现场检测具有重要意义。

附图说明

[0028] 图1为本发明实施例1中溴敌隆半抗原结构图。

[0029] 图2为本发明实施例2中每轮筛选后多克隆phage-ELISA灵敏度变化。

[0030] 图3为本发明溴敌隆纳米抗体的结构分析情况。

[0031] 图4为本发明实施例4中利用间接竞争ELISA法进行溴敌隆的检测所建标准曲线。

[0032] 图5为本发明实施例5中溴敌隆纳米抗体的酸碱(A)及热稳定性(B)试验结果。

具体实施方式

[0033] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例均按照常规实验条件,如Sambrook等分子克隆实验手册(Sambrook J&Russell DW, Molecular Cloning:a Laboratory Manual,2001),或按照制造厂商说明书建议的条件。实施例1抗溴敌隆纳米抗体免疫文库的构建

[0034] 将改造后的溴敌隆半抗原(图1)与牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)共价偶联,得到溴敌隆人工抗原BRD-BSA,取300 μ g BRD-BSA与弗氏完全佐剂混合乳化后,对羊驼(Alpaca)进行皮下多点注射免疫。加强免疫采用150 μ g BRD-BSA与弗氏不完全佐剂混合乳化,间隔三周进行,每次免疫七天后静脉取血,采用间接ELISA法测定血清效价,采用间接竞争ELISA法测定抗血清特异性及灵敏度,选择血清效价较高且特异性及灵敏度最好的样品分离淋巴细胞,提取RNA。

[0035] 采用密度梯度离心法分离外周血淋巴细胞,之后用Trizol法提取淋巴细胞RNA。以RNA为模板,oligo dT为引物,参照Invitrogen公司反转录试剂盒说明书合成cDNA第一链。

[0036] 采用Taq DNA聚合酶,经PCR获得重链抗体的可变区编码基因,上游引物为F1:5'-CATGCCATGACTGTGGCCCAGCGGCCAGKTGCAGCTCGTGGAGTCNGGNGG-3'(K、N表示简并引物,K为G或T,N为A、T、C或G),下游引物分别为R1:5'-CATGCCATGACTCGCGGCCGGCCTGGCCTCGTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3'和R2:5'-CATGCCATGACTCGCGGCCGGCCTGGCCTCGCCTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG-3'。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5min;95 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1min,30个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。将PCR产物用3%的琼脂糖凝胶电泳,经DNA片段回收试剂盒回收及定量后,放置-20 $^{\circ}$ C保存备用。将噬菌粒PAK100和PCR扩增产物分别用SfiI,50 $^{\circ}$ C酶切3小时,经琼脂糖凝胶电泳鉴定回收后,回收目的片段,以1:3摩尔比16 $^{\circ}$ C过夜连接。

[0037] 将滤膜放置于纯水上,20 μ L的连接产物滴至滤膜上透析30min,之后各取2 μ L透析产物至100 μ L大肠杆菌XL1-Blue电转感受态细胞中,电击转化(共计10管)。电转后每管加入900 μ L 2 \times YTG培养基,37 $^{\circ}$ C,250rpm振荡培养1h。取10 μ L菌液倍比稀释,涂布含氯霉素的2 \times YTG培养板,37 $^{\circ}$ C倒置培养过夜,通过菌落计数计算转化效率,通过单菌落菌液PCR测定阳性率计算库容,通过测序测定抗体库多样性。电转后的其余菌液离心弃上清,将沉淀全部涂布于氯霉素2 \times YT培养板上,37 $^{\circ}$ C倒置培养过夜。之后用2 \times YT培养基将培养板上的菌苔刮洗后,加入终浓度15-30%甘油,分装,-80 $^{\circ}$ C保存备用。

[0038] 根据计算的库容量结果,接种10倍库容量的细胞于20mL含氯霉素的2 \times YTG液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,220rpm培养至OD₆₀₀ \approx 0.5,按感染复数20:1加入辅助噬菌体M13K07,37 $^{\circ}$ C静置30min,再250rpm振荡培养30min,5000rpm离心10min,弃上清,将沉淀用生理盐水洗涤一次,最后用含有卡那霉素和氯霉素的双抗性2 \times YT培养基重悬菌体,37 $^{\circ}$ C,250rpm培养过夜。

[0039] 将过夜菌5000rpm离心10min沉淀菌体细胞,上清转移到另一无菌的50mL离心管中,加入1/5体积的PEG-NaCl(20%(w/v)PEG,2.5M NaCl),冰浴40min,12000rpm离心20min,弃上清,倒扣在吸水纸上沥干残留液体,加入1mL PBS溶解沉淀,0.45 μ m膜过滤,滤液即为初级噬菌体抗体库。

[0040] 实施例2抗溴敌隆重链单域抗体的淘选和鉴定

[0041] 采用固相亲和淘选的方法从实施例1中制备的抗溴敌隆纳米抗体库中淘选溴敌隆的纳米抗体。

[0042] 溴敌隆半抗原与卵清白蛋白 (albumin, OVA) 共价偶联, 制备包被原BRD-OVA; 包被原用包被缓冲液 (0.05M, pH 9.6, 碳酸盐缓冲液) 稀释后, 按每孔100 μ L加入微孔板中, 4 $^{\circ}$ C包被过夜 (逐轮降低包被浓度, 一到四轮的包被浓度分别为1000 μ g/mL、100 μ g/mL、10 μ g/mL、1 μ g/mL); 弃孔中液体, PBST (含0.5% v/v Tween-20的磷酸缓冲液) 洗涤3次, 拍干; 按每孔300 μ L加入3%脱脂乳, 37 $^{\circ}$ C, 封闭1.5h; 弃孔中液体, PBST洗涤3次, 拍干; 加入100 μ L/孔噬菌体抗体文库 (约含 2×10^{11} cfu), 37 $^{\circ}$ C, 孵育1h; 弃孔中液体, PBST (含0.5% Tween-20) 洗涤5次 (洗板次数逐轮增加5次), 然后用PBS洗涤5次 (洗板次数逐轮增加5次), 拍干。

[0043] 每孔加入100 μ L洗脱液 (0.2M甘氨酸, 用盐酸调至pH 2.2), 放置摇床上, 室温摇8min, 之后加入50 μ L Tris-HCl (1mol/L, pH 8.0) 中和洗脱物, 取10 μ L用于滴度测定, 其余洗脱物侵染对数期的大肠杆菌XL1-Blue, 按实施例1的方法制备下一轮的噬菌体库, 重复2中的筛选流程, 进行第二轮、第三轮及第四轮淘选, 二、三、四轮分别用500、100和20ng/mL的溴敌隆标准品于37 $^{\circ}$ C, 孵育1h进行竞争洗脱。每轮噬菌体扩增后进行多克隆phage-ELISA, 监测噬菌体抗体的性能变化情况, 结果如图2所示, 噬菌体抗体灵敏度逐轮提升。

[0044] 经四轮淘选后, 采用辅助噬菌体M13K07对随机挑取的单克隆进行救援, 分别得到展示抗体可变区的噬菌体颗粒, 再用间接phage-ELISA和间接竞争phage-ELISA测定噬菌体颗粒的结合活性和特异性, 实验设定阴性对照及背景对照。

[0045] 将ELISA阳性克隆送生物技术服务公司进行序列测定, 得到插入片段的DNA序列 (SEQ ID NO:2), 其编码如SEQ ID NO:1所示的溴敌隆的纳米抗体 (图3)。

[0046] 实施例3抗溴敌隆纳米抗体的表达纯化

[0047] 采用限制性内切酶试剂sf i I, 对重组噬菌粒pAK100-BRD及表达载体pJB33进行酶切, 1%琼脂糖凝胶电泳回收抗溴敌隆纳米抗体基因及pJB33载体基因, 用T4 DNA连接酶将得到的抗溴敌隆纳米抗体基因片段与表达载体pJB33进行连接, 之后将重组表达质粒转化至100 μ L RV308感受态细胞中。转化后立即将转化产物加入至900 μ L含 $2 \times$ YTG培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 250rpm振荡培养1h。取100 μ L菌液涂布于含30 μ g/mL氯霉素的 $2 \times$ YTG平板, 37 $^{\circ}$ C倒置培养过夜。挑取单菌落进行菌液PCR鉴定, 并提取条带正确菌株的质粒送测序, 将测序正确的菌株保存菌种。

[0048] 将测序正确的阳性克隆菌以1:100的比例接种于100mL含氯霉素的 $2 \times$ TY培养基中, 37 $^{\circ}$ C振荡培养至OD₆₀₀=0.6-1.0, 加入终浓度为0.1mM的IPTG, 25 $^{\circ}$ C诱导表达16h。诱导培养物7500rpm离心, 弃上清, 在细胞沉淀中加入20mL PBS混匀, 7500rpm离心, 弃上清; 在细胞沉淀中加入20mL PBS, 混匀, 冰上超声破碎处理, 超声破碎条件为: 功率150W, 破碎2s, 间歇5s, 共10min; 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm离心20min, 取上清进行亲和层析纯化和SDS-PAGE电泳分析, 纯化的纳米抗体用间接竞争ELISA初步测定其活性。

[0049] 通过优化诱导表达条件 (如宿主菌、表达载体、诱导培养时间、温度以及IPTG浓度等), 可以进一步提高目的蛋白表达量, 为大量制备抗溴敌隆纳米抗体提供了途径。

[0050] 实施例4抗溴敌隆纳米抗体用于溴敌隆的检测

[0051] 最佳抗原抗体浓度的选择: 采用棋盘法, 用非竞争间接ELISA模式进行测定。将包

被原BRD-OVA倍比稀释成不同浓度,按顺序加入酶标板中,每孔100 μ L。经包被、洗涤、封闭后,每孔加入50 μ L PBS,再加入50 μ L不同浓度的抗溴敌隆纳米抗体,反应30min后洗涤并加入酶标二抗,孵育后加TMB显色液,反应10min后加入终止液,在酶标仪上读取OD₄₅₀值,选取OD值接近1.5且上下左右数值差异较大的孔所对应的抗原抗体浓度为包被原和抗体的最适工作浓度。

[0052] 间接竞争ELISA标准曲线的建立:用包被液将BRD-OVA稀释至0.25 μ g/mL,100 μ L/孔包被于酶标板,4 $^{\circ}$ C过夜;PBST洗板5次,拍干;加入3%脱脂牛奶(w/v),300 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭2h。PBST洗板3次后,拍干,每孔加入50 μ L梯度稀释的溴敌隆标准品溶液,同时加入50 μ L实施例2制备的抗溴敌隆的纳米抗体,轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C温育30min。PBST洗板5次,拍干,加入辣根过氧化物酶标记的兔抗C-MYC标签抗体,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min。PBST洗板5次,拍干,加入100 μ L/孔TMB显色液,37 $^{\circ}$ C避光显色10min;加入50 μ L/孔终止液(2M H₂SO₄),酶标仪读450nm处吸光值。以溴敌隆各浓度的对数为横坐标,以溴敌隆各浓度对应的OD值为纵坐标,使用Origin8.5软件,按照四参数对数拟合绘制标准曲线。结果如图4所示,IC₅₀值为1.9ng/mL,线性检测范围为0.54-7.21ng/mL。

[0053] 实施例5溴敌隆纳米抗体的酸碱稳定性及热稳定性测定

[0054] 溴敌隆纳米抗体的酸碱稳定性及热稳定性测定操作步骤与间接竞争ELISA标准曲线的建立相似,不同之处是将抗体分别在pH5、6、7、8、9不同pH条件下反应,或先将抗体在不同温度(30 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、90 $^{\circ}$ C、100 $^{\circ}$ C)下分别处理10min,再加入微孔板进行反应。结果如图5(A和B)所示,该抗体在pH5-9之间均能正常反应,100 $^{\circ}$ C处理10min后,仍能正常工作,说明其对酸碱及高温的耐受性较强。

[0055] 实施例6纳米抗体的特异性考察

[0056] 选用交叉反应率评价SEQ ID NO:1抗体对溴敌隆的特异性。用包被液将BRD-OVA稀释至0.25 μ g/mL,100 μ L/孔包被于酶标板,4 $^{\circ}$ C过夜;PBST洗板5次,拍干;加入3%脱脂牛奶(w/v),300 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭2h。PBST洗板3次后,拍干;分别配制0ng/mL,0.032ng/mL,0.16ng/mL,0.8ng/mL,4ng/mL,20ng/mL,100ng/mL,500ng/mL的溴敌隆、大隆、噻鼠灵、华法林、氯华法林、鼠得克、克灭鼠、杀鼠醚和氟鼠灵标准液,加入50 μ L标样到各孔中,进行3个重复,同时加入50 μ L实施例2制备的抗溴敌隆的纳米抗体,轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C温育30min。PBST洗板5次,拍干,加入辣根过氧化物酶标记的兔抗C-MYC标签抗体,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min。PBST洗板5次,拍干,加入100 μ L/孔TMB显色液,37 $^{\circ}$ C避光显色10min;加入50 μ L/孔终止液(2M H₂SO₄),酶标仪读450nm处吸光值。分别计算出每一种待测类似物的IC₅₀值,利用公式,交叉反应率=[IC₅₀(溴敌隆)/IC₅₀(类似物)] \times 100%,可计算出交叉反应率。实验结果表明,该SEQ ID NO:1与溴敌隆结构类似物交叉反应率小于0.5%,说明该抗体对溴敌隆具有良好的特异性。

[0057] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

序列表

<110> 中国农业大学

<120> 溴敌隆纳米抗体及其应用

<130> KHP191115475.4

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ala Cys Ile Asn Ser Arg Asp Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Asp Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gln Lys Gly Ala Val Cys Arg Tyr Glu Ala Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

caggtgcagc tcgtggagtc cgggtggaggc ttggtgcagc ctgggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtgtag cctctggatt cagttttgat gattatgcca taggctggtt ccgccaggcc 120
 ccagggaaagg agcgtgaggg ggtcgcattg attaatagta gggatggccg cacatactat 180
 gcaaaactccg tgaagggccg attcaccata tccagagaca acgccaagga cacggtgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acagacgttt attactgtgc taagcagaag 300
 ggagccgttt gtcgctatga ggccgactac tggggccagg ggaccaggt caccgtctcc 360

tca 363

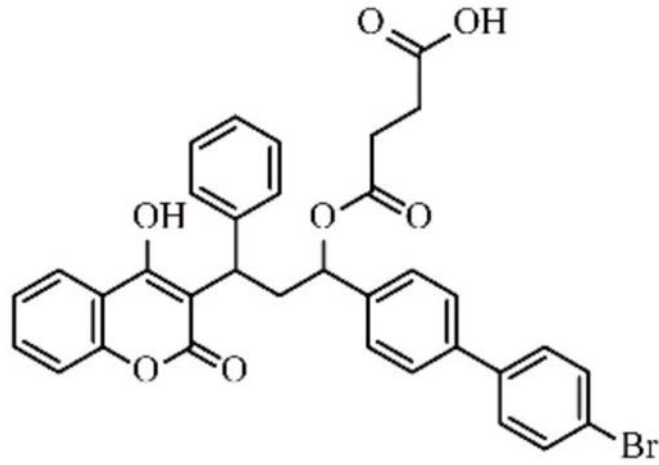


图1

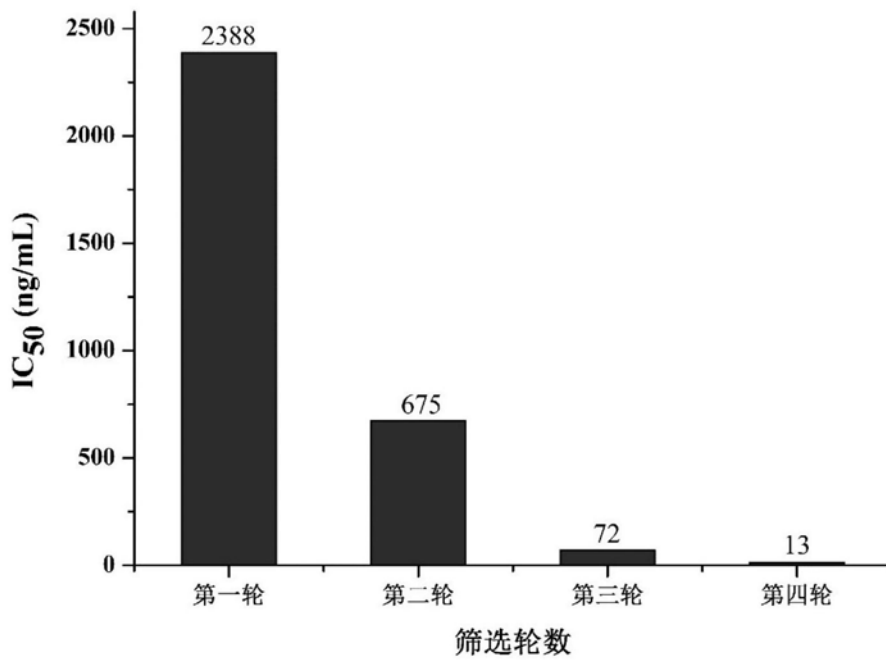


图2

Query protein sequence	Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L		
Chothia numbering	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20		
CHOTHIA REGIONS	HFR1																					
S	C	V	A	S	G	F	S	F	D	D	Y	A	I	G	W	F	R	Q	A	P	G	K
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
CDR-H1										HFR2												
E	R	E	G	V	A	C	I	N	S	R	D	G	R	T	Y	Y	A	N	S	V	K	G
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
CDR-H2										HFR3												
R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	D	T	V	Y	L	Q	M	N	S	L	K	P	E
H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83	H84	H85
D	T	D	V	Y	Y	C	A	K	Q	K	G	A	V	C	R	Y	E	A	D	Y	W	G
H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100A	H100B	H100C	H100D	H101	H102	H103	H104
										CDR-H3										HFR4		
Q	G	T	Q	V	T	V	S	S														
H105	H106	H107	H108	H109	H110	H111	H112	H113														

图3

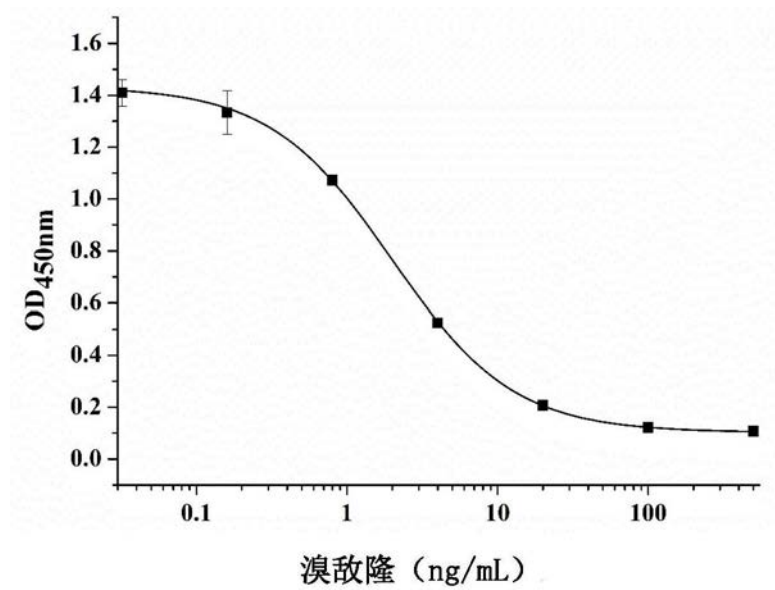


图4

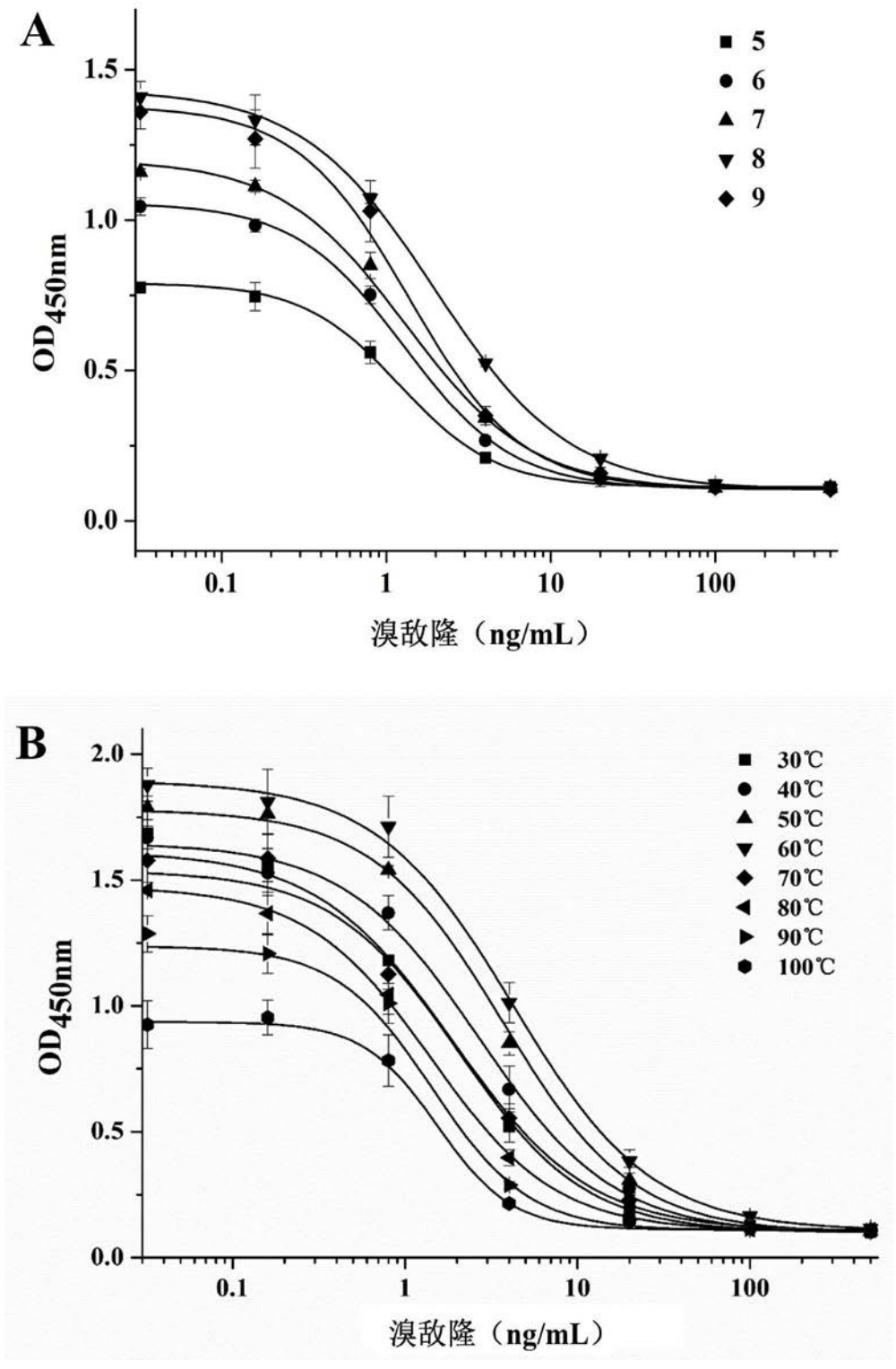


图5

专利名称(译)	溴敌隆纳米抗体及其应用		
公开(公告)号	CN110950961A	公开(公告)日	2020-04-03
申请号	CN201911268156.7	申请日	2019-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	沈建忠 王战辉 于雪芝 温凯 江海洋 杨慧娟 张素霞 史为民		
发明人	沈建忠 王战辉 于雪芝 温凯 江海洋 杨慧娟 张素霞 史为民 郭柳川		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/13 G01N33/535		
CPC分类号	C07K16/44 C07K2317/22 C07K2317/569 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/535 G01N2430/00		
代理人(译)	黄爽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种溴敌隆纳米抗体及其应用。本发明利用溴敌隆半抗原及其人工抗原免疫动物后能够产生高效价、高亲和力和特异性强的淋巴细胞，分离B淋巴细胞后，提取其RNA，构建纳米抗体文库，筛选高灵敏度的纳米抗体。可特异性结合溴敌隆的纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。该抗体的IC₅₀值为1.9ng/mL，线性检测范围为0.54-7.21ng/mL。该抗体具有结构简单、耐高温、耐酸碱以及易于生产等特性，对于溴敌隆的低成本、大批量样品的溴敌隆残留现场检测具有重要意义。

