



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110872355 B

(45) 授权公告日 2021.08.24

(21) 申请号 201810995606.1

CN 103608358 A, 2014.02.26

(22) 申请日 2018.08.29

CN 102043058 A, 2011.05.04

WO 2006107786 A2, 2006.10.12

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110872355 A

(43) 申请公布日 2020.03.10

(73) 专利权人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号
中国农业大学西校区

(72) 发明人 江海洋 谢三磊 温凯 沈建忠

王战辉 于雪芝 夏曦 李建成
史为民

(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 陈晓庆

(51) Int. Cl.

C07K 16/44 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104480072 A, 2015.04.01

CN 105112376 A, 2015.12.02

Sanlei Xie et al..A novel variable antibody fragment dimerized by the dHLX peptide with enhanced affinity against amantadine compared to its corresponding scFv antibody.《Food and Agricultural Immunology》.2017,第29卷(第1期),244-253.

Zhaopeng Wang et al..New Hapten Synthesis, Antibody Production, and Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Amantadine in Chicken Muscle.《Food Anal. Methods》.2017,第11卷302-308.

Sanlei Xie et al..Magnetic-assisted biotinylated single-chain variable fragment antibody-based immunoassay for amantadine detection in chicken.《Analytical and Bioanalytical Chemistry》.2018,第410卷6197-6205.

审查员 徐乐

权利要求书2页 说明书8页
序列表4页 附图3页

(54) 发明名称

抗金刚烷胺AMD单链抗体scFv及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抗金刚烷胺AMD单链抗体及其制备与应用。本发明能够从分泌金刚烷胺AMD的单克隆抗体的杂交瘤细胞株3F2中,通过基因工程手段获得该抗体重链和轻链可变区基因,通过将两个基因重组后,构建原核表达质粒载体,转化大肠杆菌表达出能够特异性识别AMD的scFv抗体活性片段。通过实验证明:本发明制备的重组单链抗体scFv具有与金刚烷胺AMD特异性识别和结合的活性。利用本发明的重组单链抗体对金刚烷胺的识别与结合活性可实现金刚烷胺

的残留检测,且所构建的转化载体质粒易于保存与大量生产。

1. 一种抗金刚烷胺的单链抗体,是由重链可变区、连接肽和轻链可变区组成的多肽;所述多肽从N端到C端依次为轻链可变区、连接肽和重链可变区;

所述重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.3所示的氨基酸序列;

所述轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.5所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的单链抗体,其特征在于:所述连接肽为SEQ ID No.1自N末端起第113至132位所示的氨基酸残基。

3. 根据权利要求1或2所述的单链抗体,其特征在于:所述单链抗体的氨基酸序列为SEQ ID No.1所示的氨基酸序列。

4. 权利要求1-3任一所述的单链抗体的衍生物,为如下(f1)-(f3)中任一种:

(f1) 含有权利要求1-3任一所述的单链抗体的组合物;

(f2) 含有权利要求1-3任一所述的单链抗体的免疫偶联物;

(f3) 含有权利要求1-3中任一所述的重链可变区和权利要求1-3中任一所述的轻链可变区的抗体。

5. 与权利要求1-3任一所述的单链抗体相关的生物材料,为(g1)或(g2):

(g1) 编码权利要求1-3任一所述的单链抗体的核酸分子;

(g2) 含有(g1)所述的核酸分子的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。

6. 根据权利要求5所述的生物材料,其特征在于:所述核酸分子为如下(h1)-(h3)中任一种:

(h1) SEQ ID No.2所示的DNA分子;

(h2) 与(h1)限定的核苷酸序列具有75%以上同一性,且编码权利要求1-3任一所述的单链抗体的DNA分子;

(h3) 在严格条件下与(h1)或(h2)限定的核苷酸序列杂交,且编码权利要求1-3任一所述的单链抗体的DNA分子。

7. 权利要求1-3任一所述的单链抗体或权利要求4所述的衍生物或权利要求5或6所述的生物材料在如下(1)-(2)中任一种中的应用:

(1) 特异性识别和结合金刚烷胺;

(2) 制备特异性识别和结合金刚烷胺的产品。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于:所述应用为如下(1)-(4)中任一种:

(1) 检测待测样品中是否含有金刚烷胺;

(2) 制备检测待测样品中是否含有金刚烷胺的产品;

(3) 检测待测样品中金刚烷胺含量;

(4) 制备检测待测样品中金刚烷胺含量的产品。

9. 权利要求5或6所述的生物材料在制备权利要求1-3任一所述的单链抗体中的应用。

10. 制备权利要求1-3任一所述的单链抗体的方法,是发酵培养权利要求5中所述的重组菌,得到所述单链抗体。

11. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于:所述方法包括如下步骤:

(1) 将权利要求1-3任一所述的单链抗体的编码基因导入宿主菌中,得到重组菌;

(2) 诱导表达所述重组菌,得到所述单链抗体。

12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于:所述权利要求1-3任一所述的单链抗体

的编码基因通过重组载体导入宿主菌;所述重组载体是将所述权利要求1-3任一所述的单链抗体的编码基因插入表达载体的酶切位点间得到的。

抗金刚烷胺AMD单链抗体scFv及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种金刚烷胺AMD单链抗体scFv及其制备方法,具体涉及所述单链抗体的蛋白序列及其编码基因序列,含有所述编码基因的载体及制备所述单链抗体的方法,属于生物制品领域。

背景技术

[0002] 在畜牧养殖中金刚烷胺等抗病毒药物用于A型流感病毒预防和治疗,但是金刚烷胺的滥用容易引起耐药性、促进毒株变异而危害人类健康,并且具有神经毒性等一系列的副作用,如引起人神经过敏、焦虑、噩梦等症状。我国农业部2005年第560号公告明确规定金刚烷胺和金刚乙胺等抗病毒药物在兽医上禁止使用,美国FDA于2006年也禁止将金刚烷胺和金刚乙胺等人类抗病毒药物用于畜禽类。因此,急需建立鸡肉中该类残留药物的快速检测方法,以加强对该类药物的残留监管,有效保护人类健康。

[0003] 目前已报道的金刚烷胺残留检测方法多采用仪器方法,虽然具有灵敏度高、结果准确等优点,但是不能达到快速、操作简便的要求。以单克隆抗体为基础的免疫检测方法具有快速、成本低、易操作的特点,但是随着蛋白质工程技术的发展单链抗体作为单克隆抗体的替代者,具有易大规模生产,成本低、可修饰等优点。scFv是用基因工程方法将抗体重链和轻链可变区通过一段连接肽连接而成的重组蛋白,是保持了亲本抗体的抗原性和特异性的最小功能型抗体片段。scFv分子由于只保留了抗体的VH和VL部分,去除了不与抗原结合的部分,大小相当于完整IgG的1/6,可与底物显色酶、荧光分子、标签分子等融合或标记。作为单克隆抗体的替代物,由于其对抗原的单价结合特性,操作性强(突变进化等),scFv在免疫检测领域,特别是小分子检测方面,展示出了更为灵敏的检测性能。

[0004] 目前关于金刚烷胺AMD单链抗体scFv的研究国内外未见报道,相关专利的申请国内外亦未见报道。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种抗金刚烷胺的单链抗体。

[0006] 本发明提供的抗金刚烷胺的单链抗体是由重链可变区、连接肽和轻链可变区组成的多肽;所述连接肽位于所述重链可变区与所述轻链可变区之间;

[0007] 所述重链可变区的氨基酸序列为(a1)或(a2)或(a3)或(a4):

[0008] (a1)包括SEQ ID No.3所示的氨基酸序列;

[0009] (a2)SEQ ID No.3所示的氨基酸序列;

[0010] (a3)将SEQ ID No.3所示的氨基酸序列经过一个或两个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的氨基酸序列;

[0011] (a4)与SEQ ID No.3所示的氨基酸序列具有75%或75%以上的同源性且具有相同功能的氨基酸序列;

[0012] 所述轻链可变区的氨基酸序列为(b1)或(b2)或(b3)或(b4):

- [0013] (b1) 包括SEQ ID No.5所示的氨基酸序列；
- [0014] (b2) SEQ ID No.5所示的氨基酸序列；
- [0015] (b3) 将SEQ ID No.5所示的氨基酸序列经过一个或两个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的氨基酸序列；
- [0016] (b4) 与SEQ ID No.5所示的氨基酸序列具有75%或75%以上的同源性且具有相同功能的氨基酸序列。
- [0017] 上述单链抗体中,所述连接肽为SEQ ID No.1自N末端起第113至132位所示的氨基酸残基。
- [0018] 上述单链抗体中,所述单链抗体的氨基酸序列为(c1)或(c2)或(c3)：
- [0019] (c1) SEQ ID No.1所示的氨基酸序列；
- [0020] (c2) 将SEQ ID No.1所示的氨基酸序列经过一个或两个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的氨基酸序列；
- [0021] (c3) 与SEQ ID No.1所示的氨基酸序列具有75%或75%以上的同源性且具有相同功能的氨基酸序列。
- [0022] 本发明的另一个目的是提供上述单链抗体的衍生物。
- [0023] 所述衍生物为如下(f1) - (f6) 中任一种：
- [0024] (f1) 含有上述单链抗体的融合蛋白；
- [0025] (f2) 含有上述单链抗体的多特异或多功能分子；
- [0026] (f3) 含有上述单链抗体的组合物；
- [0027] (f4) 含有上述单链抗体的免疫偶联物；
- [0028] (f5) 将上述单链抗体或其抗原结合部分进行修饰和/或改造后得到的抗体；
- [0029] (f6) 含有上述重链可变区和/或上述轻链可变区的抗体。
- [0030] 本发明又有一个目的是提供与上述单链抗体相关的生物材料。
- [0031] 所述生物材料为(g1)或(g2)：
- [0032] (g1) 编码上述单链抗体的核酸分子；
- [0033] (g2) 含有(g1)所述的核酸分子的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。
- [0034] 上述生物材料中,所述核酸分子为如下(h1) - (h3) 中任一种：
- [0035] (h1) SEQ ID No.2或SEQ ID No.4或SEQ ID No.6所示的DNA分子；
- [0036] (h2) 与(h1)限定的核苷酸序列具有75%或75%以上同一性,且编码上述单链抗体或上述重链可变区或上述轻链可变区的DNA分子；
- [0037] (h3) 在严格条件下与(h1)或(h2)限定的核苷酸序列杂交,且编码上述单链抗体或上述重链可变区或上述轻链可变区的DNA分子。
- [0038] 其中,SEQ ID No.2所示的DNA分子为上述单链抗体的编码基因序列；
- [0039] SEQ ID No.4所示的DNA分子为上述单链抗体重链可变区的编码基因序列；
- [0040] SEQ ID No.6所示的DNA分子为上述单链抗体轻链可变区的编码基因序列。
- [0041] 上述生物材料中,所述重组载体为将SEQ ID No.2所示的DNA分子插入载体pJB33的Sfi I酶切位点间得到的载体。该重组载体表达SEQ ID No.1所示的单链抗体scFv。所述重组菌为将所述重组载体导入RV308宿主细胞得到的菌。
- [0042] 本发明还有一个目的是提供上述单链抗体或衍生物或生物材料的新用途。

[0043] 本发明提供了上述单链抗体或衍生物或生物材料在如下(1)-(8)中任一种中的应用:

[0044] (1) 特异性识别和/或结合金刚烷胺;

[0045] (2) 制备特异性识别和/或结合金刚烷胺的产品;

[0046] (3) 金刚烷胺残留检测;

[0047] (4) 制备金刚烷胺残留检测的产品;

[0048] (5) 检测待测样品中是否含有金刚烷胺;

[0049] (6) 制备检测待测样品中是否含有金刚烷胺的产品;

[0050] (7) 检测待测样品中金刚烷胺含量;

[0051] (8) 制备检测待测样品中金刚烷胺含量的产品。

[0052] 上述生物材料在制备上述单链抗体中的应用也属于本发明的保护范围。

[0053] 本发明最后提供了制备上述单链抗体的方法。

[0054] 本发明提供的制备上述单链抗体的方法是发酵培养上述重组菌,得到所述单链抗体。

[0055] 所述方法包括如下步骤:

[0056] (1) 将上述单链抗体的编码基因导入宿主菌中,得到重组菌;

[0057] (2) 诱导表达所述重组菌,得到所述单链抗体。

[0058] 上述方法中,所述单链抗体的编码基因通过重组载体导入宿主菌;

[0059] 所述重组载体是将所述单链抗体的编码基因插入表达载体的酶切位点间得到的。

[0060] 上述方法中,所述诱导表达的方法具体如下:将重组菌接种于 $2 \times \text{YT-G}$ 培养基中,振荡培养至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=1.0$ 时加入IPTG诱导表达,在诱导培养16h时收集菌液,离心,收集菌体沉淀。用渗透休克提取液重悬所述菌体沉淀,离心,收集上清液A和菌体沉淀A,并向菌体沉淀A中加入无菌水重悬沉淀,离心,收集上清液B,合并上清液A和上清液B,得到单链抗体表达的周质腔提取物,所述提取物中含有所述单链抗体。

[0061] 进一步的,所述单链抗体的编码基因为SEQ ID No.2所示的DNA分子。

[0062] 更进一步的,所述表达载体具体可为PJB33。

[0063] 所述宿主菌可为大肠杆菌,所述大肠杆菌具体为RV308。

[0064] 本发明针对抗体杂交瘤细胞株在大规模生产上容易突变,细胞株不稳定,基因容易丢失,代价昂贵等诸多缺点,应用基因工程手段提供了一种抗金刚烷胺AMD的单链抗体及其制备方法。本发明首先从一株单克隆抗体杂交瘤细胞株,通过PCR方法克隆得到抗体的重链与轻链可变区基因,序列测定后在NCBI中BLAST比较分析后,确认重链可变区基因序列为序列表中SEQ ID No.4所示的核苷酸序列,其编码的蛋白序列为序列表中SEQ ID No.3所示的氨基酸序列;重链可变区基因序列为SEQ ID No.6所示核苷酸序列,其编码的氨基酸序列为SEQ ID No.5所示氨基酸序列。上述重链、轻链可变区基因经过重组后,构建载体质粒转入大肠杆菌后可溶性表达出特异性识别和结合金刚烷胺的scFv抗体。实验结果表明,scFv抗体的抑制中浓度(IC_{50})为 17ng/ml ,最低检测线为 5ng/ml ,线性检测范围为 $4.6\text{--}42\text{ng/ml}$ 。本发明的重链和轻链可变区基因也可采用基因工程方法,构建表达载体表达多种形式的小分子基因工程抗体,如嵌合抗体、scFv抗体、抗体融合蛋白和导向药物载体等,并具备用于金刚烷胺AMD帕金森药物靶向诊断的应用前景。

附图说明

[0065] 图1为提取的总RNA琼脂糖凝胶电泳图。

[0066] 图2为PCR扩增3F2单克隆抗体重链、轻链可变区基因的琼脂糖凝胶电泳图。lane1、2、3分别为单克隆抗体重链、轻链及拼接后全长基因序列。

[0067] 图3为3F2单链抗体scFv基因的PCR产物电泳图。lane1-22为随机挑取转化后单菌落。

[0068] 图4为SDS变性凝胶电泳图。从左自右lane 1为Protein Marker, lane 2为纯化后scFv, lane 3为Western blot鉴定结果。

[0069] 图5为间接竞争ELISA建立的检测金刚烷胺的标准抑制曲线。

具体实施方式

[0070] 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验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0071] 下述实施例中的载体pJB33记载于文献:Schaefer, J.V., Lindner, P., and Plückthun, A. (2010) in *Antibody Engineering: Miniantibodies* (Kontermann, R., and Dübel, S., eds) Vol. 2, 2nd edit., pp. 85-99, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Germany. 中, 公众可从中国农业大学获得。

[0072] 实施例一、抗金刚烷胺单克隆抗体3F2的获得及其重链和轻链可变区基因序列的克隆

[0073] 一、抗金刚烷胺单克隆抗体3F2的获得

[0074] 1、杂交瘤细胞株3F2的建立

[0075] 参考文献“New Hapten Synthesis, Antibody Production, and Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Amantadine in Chicken Muscle”中的方法合成金刚烷胺全抗原,以合成的金刚烷胺全抗原作为免疫原免疫小鼠,小鼠三次免疫后取小鼠血清采用间接ELISA方法进行抗体效价检测,效价合格者进行加强免疫用于细胞融合,待融合的细胞克隆生长到1/4-1/3时,利用间接ELISA方法对细胞培养上清进行检测,最终筛选得到一株稳定分泌抗金刚烷胺单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞,并将其命名为杂交瘤细胞株3F2。

[0076] 2、抗金刚烷胺单克隆抗体3F2的制备

[0077] 将步骤1获得的杂交瘤细胞株3F2进行培养、传代,重悬后接种于小鼠腹腔,10天后待腹部膨胀后采集腹水约15ml。采用快速批次吸附法纯化鼠腹水中的抗金刚烷胺抗体,并用饱和硫酸铵法进行纯化,得到抗金刚烷胺单克隆抗体,并将其命名为抗金刚烷胺单克隆抗体3F2。

[0078] 3、抗金刚烷胺单克隆抗体3F2的鉴定

[0079] 对步骤2获得的抗金刚烷胺单克隆抗体3F2的抗体类型进行鉴定。结果表明:抗金刚烷胺单克隆抗体3F2的亚型为IgG1 (G1, Kappa), 其重链、轻链同种型为 $\gamma 1/\kappa$ 。具有良好的抗原特异性和抗原亲和力。

[0080] 二、抗金刚烷胺单克隆抗体3F2的重链、轻链可变区基因的克隆

[0081] 1、取对数生长期的杂交瘤细胞株3F2 (2×10^6)，采用Trizol (Invitrogen) 试剂提取总RNA (参照Invitrogen公司的Trizol抽提总RNA说明书)，分离纯化mRNA (参照Promega公司的PolyAtract mRNA Isolation Systems说明书)，按照Invitrogen试剂盒 (SuperScript III First-Strand Synthesis System For RT-PCR)，以Oligo (dT) 20为引物，RT-PCR逆转录合成cDNA。提取的RNA的琼脂糖凝胶电泳图如图1所示。

[0082] 2、以步骤1合成的cDNA为模板，分别采用VHF/VHR、VLF/VLR引物进行PCR扩增，分别扩增得到3F2单克隆抗体的重链可变区基因和轻链可变区基因。引物序列如下：

[0083] VHF: 5' -ACCCAGCACCGTCAGTTTGGTG-3' ;

[0084] VHR: 5' -GAAGTGCAGCTGCAAGAATCTG-3' ;

[0085] VLF: 5' -CCTGTGAACCGCCACCGCCCGAGGAAACGGTCACCGTGGTA-3' ;

[0086] VLR: 5' -TTCTGGCGGTGGCGGTAGTCAAG CAGTGGTGACGCAGGAAT-3' 。

[0087] 3、1%琼脂糖凝胶电泳PCR扩增产物，并用胶回收试剂盒 (Promega公司) 回收片段。通过TA克隆将扩增产物插入pMD18-T载体并对其序列进行测定和BLAST分析。3F2单克隆抗体重链、轻链可变区基因的琼脂糖凝胶电泳图如图2所示。

[0088] 序列测定和分析结果表明：3F2单克隆抗体重链可变区基因序列为序列表中SEQ ID No.4所示的核苷酸序列，其编码的蛋白序列为序列表中SEQ ID No.3所示的氨基酸序列；轻链可变区基因序列为SEQ ID No.6所示核苷酸序列，其编码的氨基酸序列为SEQ ID No.5所示氨基酸序列。通过Overlap-PCR方法拼接3F2单克隆抗体重链可变区基因序列和轻链可变区基因序列，得到SEQ ID No.1所示的拼接后基因序列，即金刚烷胺AMD单链抗体scFv基因。金刚烷胺AMD单链抗体scFv基因编码的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

[0089] 实施例二、金刚烷胺AMD单链抗体scFv的制备

[0090] 一、重组表达载体的构建

[0091] 将SEQ ID No.2所示的DNA分子插入载体pJB33的Sfi I酶切位点间，得到重组表达载体。重组表达载体表达SEQ ID No.1所示的单链抗体scFv。

[0092] 二、重组菌的构建

[0093] 将步骤一制备的重组表达载体电击转化至RV308感受态细胞 (购自美国标准生物品收藏中心，ATCC编号为31608) 中，得到重组菌。电击转化条件如下：电压2.25kV；电阻200 Ω ；电容25 μ F；时间0.002s。

[0094] 三、金刚烷胺AMD单链抗体scFv的表达与纯化

[0095] 1、重组菌的培养

[0096] 将步骤二制备的重组菌接种至900 μ L $2 \times$ YT-G培养基 (3.4g胰蛋白胨，2.0g酵母粉，1.0g NaCl，1000mL ddwater) 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 $2 \times$ YT-G平板上，37 $^{\circ}$ C静置培养过夜。

[0097] 2、重组菌的鉴定

[0098] 从重组菌转化平板上挑取10个单菌落进行菌液PCR鉴定。

[0099] PCR反应体系如下 (总体积为20 μ L)：转化子菌液1 μ L、pJB33上游引物 (5' -CTCAGTCAACACTCACCCCTGTTG-3') 0.5 μ L、pJB33下游引物 (5' -CGAGAAAGGAAGGGAAGAAAG C-3') 0.5 μ L、普通ExTaq mix 10 μ L、无菌纯水8 μ L。

[0100] PCR扩增反应程序如下:94℃预变性5min,94℃5s,58℃1min,72℃2min,共进行30个循环,72℃延伸10min。

[0101] 反应完毕后,产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定,PCR扩增得到大小为1200bp的重组菌为阳性重组菌(图3)。

[0102] 3、金刚烷胺AMD单链抗体scFv的表达

[0103] (1) 经鉴定正确的阳性重组菌以1:100的比例接种于100mL含30μg/mL氯霉素的2×YT-G培养基中,37℃振荡培养至OD_{600nm}=1.0时加入IPTG(0.5mM)诱导表达,在诱导培养16h时收集菌液5mL,测定菌液OD_{600nm}值,4℃、12000×g离心5分钟后分别收集菌体沉淀和培养基上清备用。用0.5mL渗透休克提取液(渗透休克提取液配方如下:在50mL 40%蔗糖溶液中加入2mL 1.5M Tris-HCl溶液、10mL 5mMEDTA钠溶液,混匀,调整pH值至8.0,加水定容至100mL)彻底重悬菌体沉淀,室温下震荡10min,4℃、12000×g离心5分钟,收集上清液A和菌体沉淀A,并向菌体沉淀A中加入0.5mL无菌纯水彻底重悬沉淀,冰浴震荡10min,4℃、12000×g离心5分钟,收集上清液B和菌体沉淀B,合并上清液A和上清液B,即为单链抗体表达的周质腔提取物(含有单链抗体scFv,scFv蛋白),保存于4℃备用。

[0104] (2) 使用PBS重悬最终剩余沉淀(步骤(1)中收集的菌体沉淀A和菌体沉淀B),用于计算上清液中的scFv蛋白表达量,保存于4℃备用。根据上述提取产物的浓缩倍数及原始表达菌株培养物的菌体浓度进行计算,取等量表达菌体的表达产物进行SDS变性凝胶电泳分析和免疫印迹分析,将各个样品所对应的原始菌液OD_{600nm}值调节至约等于2,使其电泳及免疫印迹分析结果更易于对比、更直观。

[0105] 结果如图4所示。从图中可以看出:得到的scFv蛋白分子量大小符合预期的30kDa,目的条带单一。

[0106] 4、金刚烷胺AMD单链抗体scFv的纯化

[0107] 按照上述方法,大批量诱导阳性重组菌表达,得到2L含有分泌型scFv蛋白的菌液。将菌液在4℃、12000×g条件下离心30min,弃上清液,收集菌体沉淀,并将其重悬在100mL纯化柱(HisTrapTM HP Columns)的结合缓冲液binding buffer中,然后420W功率冰浴超声(超声3s,停8s)破碎菌体至悬液变澄清,再4℃、12000rpm离心10min,收集上清液,即为scFv蛋白提取液。利用表达载体上带有的6×His-tag标记通过镍离子亲和层析纯化scFv蛋白,具体步骤如下:

[0108] (1) 用10倍体积的超纯水洗柱(HisTrapTM HP Columns)。

[0109] (2) 用10倍柱体积的binding buffer平衡HisTrapTM HP Columns,加入上述scFv蛋白提取液。

[0110] (3) 用5倍柱体积的washing buffer洗脱杂蛋白。

[0111] (4) 用10倍柱体积的elution buffer洗脱目的蛋白,收集洗脱液。

[0112] (5) 用蛋白透析液4℃透析48h收集的蛋白,得到纯化的scFv蛋白。

[0113] 收集每一步骤的洗脱液,在280nm波长处检测紫外吸收峰,并对纯化的scFv蛋白做SDS变性凝胶电泳分析和免疫印迹分析。具体步骤如下:取每步收集的产物20μL,向其中加入5×蛋白上样缓冲液(全式金生物技术有限公司,DL101-02),100℃水浴10min。

[0114] 结果如图4所示。从图中可以看出:得到的纯化后scFv蛋白分子量大小符合预期的30kDa,SDS-PAGE和Western blot结果显示目的蛋白条带单一,可以用于后续活性验证试

验。

[0115] 实施例三、金刚烷胺AMD单链抗体scFv的灵敏度和特异性测定

[0116] 一、包被原的合成

[0117] 1、包被原AMD-BSA的合成

[0118] (1) 称取500mg AMD溶于25mL无水吡啶,分别加入10mg 4-二甲氨基吡啶(DMAP)和705mg对羧基苯磺酰氯,室温搅拌过夜,加入少量去离子水终止反应,蒸干溶液,加入10mL去离子水,1M NaOH调pH至9.0,使残留物完全溶解,再使用冰乙酸调pH至5.0,此时析出大量白色沉淀,过滤,将滤饼干燥,即获得半抗原AMA-CSBA。

[0119] (2) 称取16.2mg步骤(1)制备的半抗原AMA-CSBA溶于1mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液中,分别加入17.2mg二环己基碳二亚胺(DCC)和20.6mg羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温搅拌反应3h,得到活化的半抗原。

[0120] (3) 称取50mg牛血清白蛋白(BSA)溶于5mL 0.13M NaHCO_3 溶液,得到BSA蛋白溶液;然后将步骤(2)制备的活化的半抗原逐滴加入到BSA蛋白溶液中,室温搅拌过夜,0.01M PBS溶液4℃透析24h,然后于5000g离心10min,收集上清液,即得到包被原AMD-BSA溶液。

[0121] 2、包被原AMD-OVA的合成

[0122] (1) 称取16.2mg步骤(1)制备的半抗原AMA-CSBA溶于1mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液中,分别加入17.2mg二环己基碳二亚胺(DCC)和20.6mg羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温搅拌反应3h,得到活化的半抗原。

[0123] (2) 称取30mg卵清蛋白(OVA)溶于5mL 0.13M NaHCO_3 溶液,得到OVA蛋白溶液;然后将步骤(1)制备的活化的半抗原逐滴加入到OVA蛋白溶液中,室温搅拌过夜,0.01M PBS溶液4℃透析24h,然后于5000g离心10min,收集上清液,即得到包被原AMD-OVA溶液。

[0124] 二、scFv和包被原浓度的选择

[0125] 1、包被:用包被液(Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g,去离子水定容至1L)将AMD-OVA或AMD-BSA包被原稀释至浓度为0.5μg/mL,加至96孔板中,100μL/孔,4℃过夜;

[0126] 2、洗涤:去除孔内液体,加入洗涤液PBST,250μL/孔,洗涤3次,每次间隔1min,在吸水纸上拍干;

[0127] 3、封闭:每孔加入200μL封闭液,37℃封闭2h,洗涤1次,拍干;

[0128] 4、加样:每孔分别加入50μL不同浓度的AMD标准品溶液(27ng/mL,9ng/mL,3ng/mL,1ng/mL,0.3ng/mL,0.1ng/mL,0.03ng/mL;溶剂为PBS溶液,配方如下: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.593g,NaCl 8.5g,KCl 0.2g,去离子水定容至1L)和50μL的AMD单链抗体溶液(实施例二中的纯化后scFv,蛋白浓度为0.43mg/mL),37℃孵育30min;洗涤同上;

[0129] 5、加入二抗:加入100μL HRP标记的抗C-myc单克隆抗体(南京金斯瑞生物科技有限公司,A00173)(1:10000),37℃反应30min,洗涤同上;

[0130] 6、显色:每孔加入100μL TMB显色液,显色10min,迅速加入50μL的终止液(2mol/L硫酸);

[0131] 7、测定:用酶标仪测量OD450nm。

[0132] 8、标准曲线绘制:以AMD标准品的浓度对数值为横坐标,OD450nm处的吸光值为纵坐标绘制标准曲线,并通过originPro8.0软件,用四参数Logistic曲线拟合方程,方程如下:

[0133]
$$Y = \frac{A - D}{1 + (X/C)^B} + D$$

[0134] 其中,A、B、C、D是常数,A为最低结合率;B是曲线在中点(C, (D+A)/2)处的斜率;C为y = (D+A)/2对应的X值(IC₅₀);D为最高结合率(即零标准品时的结合率)。A、B、C、D的数值分别如下:A:1;B:3;C:17.7044;D:0.16252。根据曲线计算抗原抗体结合50%时的各竞争物浓度(IC₅₀)。

[0135] 结果表明:本发明的金刚烷胺AMD单链抗体scFv检测AMD的IC₅₀值为17ng/ml,最低检测线为5ng/ml,线性检测范围为4.6-42ng/ml。

[0001]	序列表															
[0002]	<110>中国农业大学															
[0003]	<120>抗金刚烷胺AMD单链抗体scFv及其制备方法与应用															
[0004]	<160>6															
[0005]	<170>PatentIn version 3.5															
[0006]	<210>1															
[0007]	<211>246															
[0008]	<212>PRT															
[0009]	<213>人工序列(Artificial Sequence)															
[0010]	<400>1															
[0011]	Asp	Val	Leu	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly
[0012]	1				5					10					15	
[0013]	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser
[0014]					20					25					30	
[0015]	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
[0016]					35					40					45	
[0017]	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
[0018]					50					55					60	
[0019]	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
[0020]	65						70					75				80
[0021]	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Gln	Gly
[0022]							85					90				95
[0023]	Ser	His	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
[0024]							100					105				110
[0025]	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
[0026]							115					120				125
[0027]	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Tyr	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val
[0028]							130					135				140
[0029]	Arg	Ser	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Arg
[0030]	145						150					155				160
[0031]	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Leu	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln	Gly
[0032]							165					170				175
[0033]	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr
[0034]							180					185				190
[0035]	Asn	Gln	Lys	Phe	Arg	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser
[0036]							195					200				205
[0037]	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Ala
[0038]							210					215				220

[0039]	Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Asp Gly His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
[0040]	225	230 235 240
[0041]	Ser Val Thr Val Ser Ser	
[0042]	245	
[0043]	<210>2	
[0044]	<211>738	
[0045]	<212>DNA	
[0046]	<213>人工序列(Artificial Sequence)	
[0047]	<400>2	
[0048]	gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgggga tcaagcctcc	60
[0049]	atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg	120
[0050]	tacctacaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt	180
[0051]	tctgggggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcaggaa cagatttcac actcaaaaatc	240
[0052]	agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgtg ttcaaggttc acatcttccg	300
[0053]	tacacgttcg ggggggggac caagctggaa ataaaagggtg gtggtggttc tgggtggtgt	360
[0054]	ggttctggcg gcggcggtc cggtggtggt ggatcccagg cttatctaca gcagtctggg	420
[0055]	gctgagctgg tgaggtctgg ggcctcagt aagatgtcct gcaaggcttc tggctacaga	480
[0056]	tttaccagtt acaatttgca ctgggtgaag cagacacctg ggcagggcct ggaatggatt	540
[0057]	ggatatatatt atcctggaaa tgggtgtacc aactacaatc agaagttcag gggcaaggcc	600
[0058]	acgttgactg cagacacatc ctccagcaca gcctacatgc agctcagcag cctgacatat	660
[0059]	gaagactctg cggctctattt ctgtgcaaga gatgatggcc actactgggg tcaaggaacc	720
[0060]	tcagtcaccg tctcttca	738
[0061]	<210>3	
[0062]	<211>114	
[0063]	<212>PRT	
[0064]	<213>人工序列(Artificial Sequence)	
[0065]	<400>3	
[0066]	Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala	
[0067]	1	5 10 15
[0068]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr	
[0069]	20	25 30
[0070]	Asn Leu His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[0071]	35	40 45
[0072]	Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	
[0073]	50	55 60
[0074]	Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[0075]	65	70 75 80
[0076]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Tyr Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
[0077]	85	90 95

[0078]	Ala Arg Asp Asp Gly His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
[0079]	100 105 110
[0080]	Ser Ser
[0081]	<210>4
[0082]	<211>342
[0083]	<212>DNA
[0084]	<213>人工序列(Artificial Sequence)
[0085]	<400>4
[0086]	caggcttatac tacagcagtc tggggctgag ctggtgaggt ctggggcctc agtgaagatg 60
[0087]	tcctgcaagg cttctggcta cagatttacc agttacaatt tgcactgggt gaagcagaca 120
[0088]	cctgggcagg gcctggaatg gattggatat atttatcctg gaaatggtgg taccaactac 180
[0089]	aatcagaagt tcaggggcaa ggccacgttg actgcagaca catcctccag cacagcctac 240
[0090]	atgcagctca gcagcctgac atatgaagac tctgcggtct atttctgtgc aagagatgat 300
[0091]	ggccactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctctt ca 342
[0092]	<210>5
[0093]	<211>112
[0094]	<212>PRT
[0095]	<213>人工序列(Artificial Sequence)
[0096]	<400>5
[0097]	Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
[0098]	1 5 10 15
[0099]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
[0100]	20 25 30
[0101]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0102]	35 40 45
[0103]	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0104]	50 55 60
[0105]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0106]	65 70 75 80
[0107]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
[0108]	85 90 95
[0109]	Ser His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0110]	100 105 110
[0111]	<210>6
[0112]	<211>338
[0113]	<212>DNA
[0114]	<213>人工序列(Artificial Sequence)
[0115]	<400>6
[0116]	gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgggga tcaagcctcc 60

[0117] atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
[0118] tacctacaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
[0119] tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggaa cagatttcac actcaaaatc 240
[0120] agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgtg ttcaaggttc acatcttccg 300
[0121] tacacgttcg ggggggggac caagctggaa ataaaagg 338

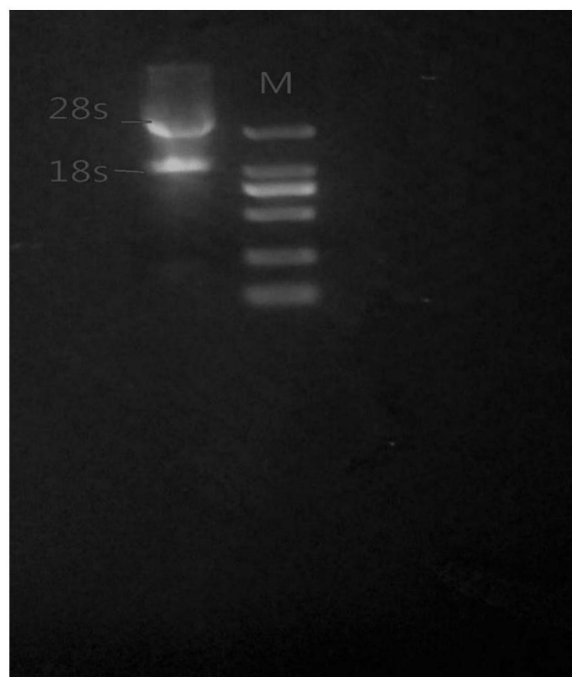


图1

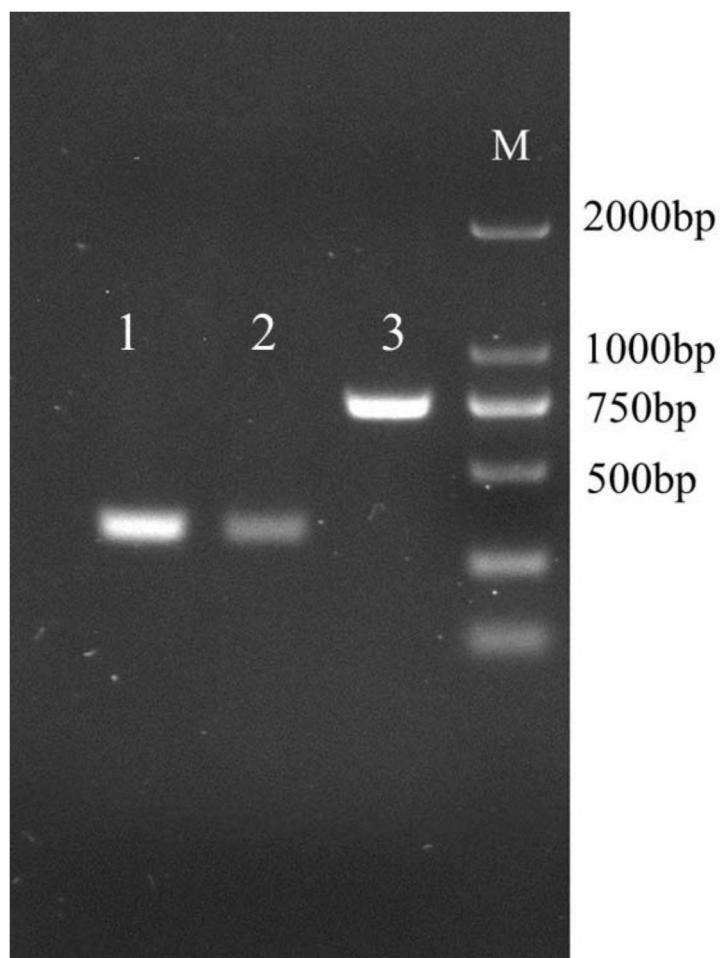


图2

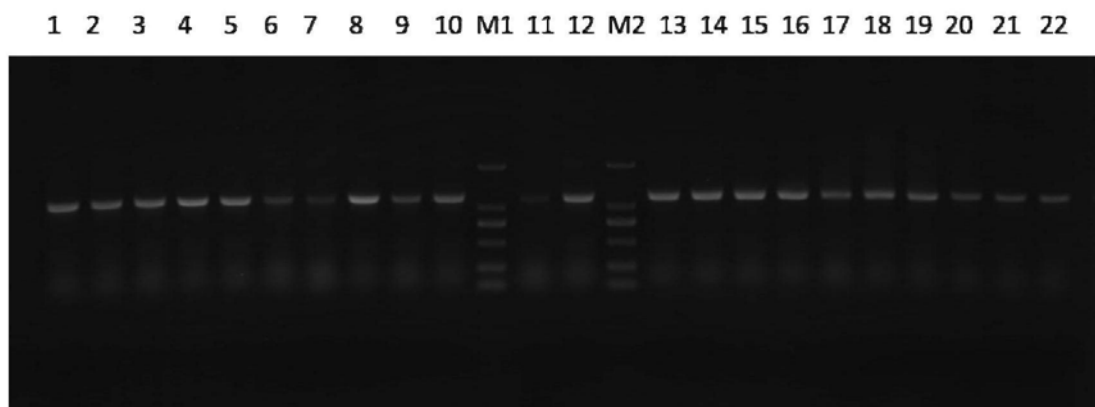


图3

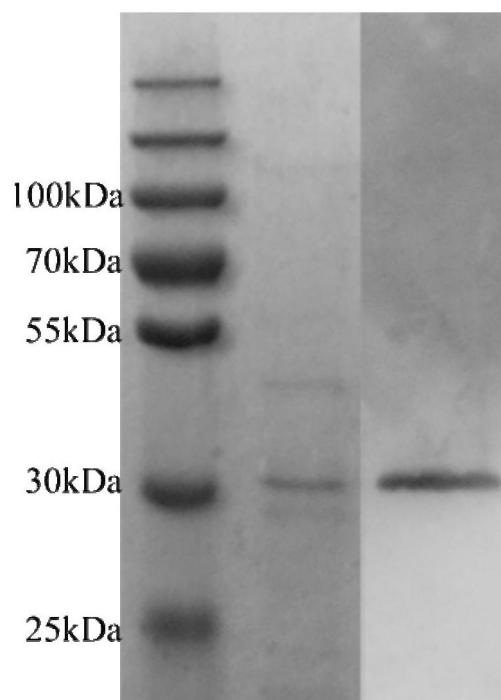


图4

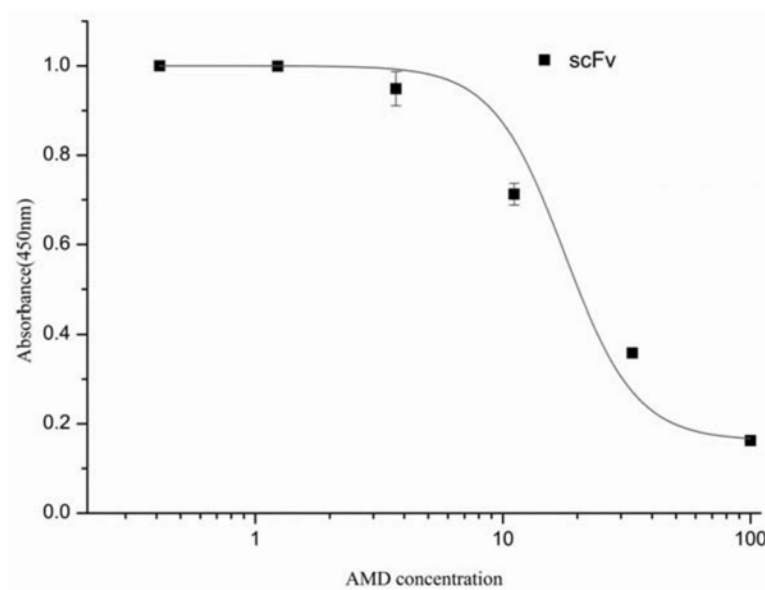


图5