



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102276719 A

(43) 申请公布日 2011.12.14

(21) 申请号 201010201473. X

(22) 申请日 2010.06.09

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 阎锡蕴 穆彬 庄洁 杨东玲
冯静 卢迪

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 陈长会

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页
序列表 2 页 附图 8 页

(54) 发明名称

禽流感病毒单域抗体、五聚抗体及其制备和应用

(57) 摘要

本发明涉及对禽流感病毒具有特异结合能力的单域抗体及其制备方法。本发明还涉及对禽流感病毒具有特异结合能力的五聚抗体,及其制备方法和应用。本发明还涉及对禽流感病毒具有特异结合能力的磁性五聚抗体及利用该磁性五聚抗体检测禽流感病毒的方法。

1. 获得对禽流感病毒具有特异结合能力的单域抗体的方法,其特征在于所述方法包括下列步骤:

- 1) 建立禽流感病毒免疫单域抗体噬菌体库,和
- 2) 利用噬菌体展示技术从所述单域抗体噬菌体库中筛选对禽流感病毒亲和力高的单域抗体克隆,

其中,优选地,所述禽流感病毒是流感疫苗 H5N1 亚型 Re1 株和 H5N2 亚型 N28 株。

2. 一种对禽流感病毒具有特异结合能力的单域抗体,其特征在于所述单域抗体是通过权利要求 1 的方法获得的。

3. 一种对禽流感病毒具有特异结合能力的单域抗体,其特征在于所述单域抗体的氨基酸序列如 SEQ ID No :1 所示。

4. 一种对禽流感病毒具有特异结合能力的五聚抗体,其特征在于所述五聚抗体是由权利要求 2 或 3 所述的单域抗体通过五聚体核心形成的五聚抗体,其中所述五聚体核心可以是含有志贺氏毒素 B 亚基基因片段的五聚体载体,优选是 pVT2。

5. 权利要求 4 所述的五聚抗体,其特征在于所述五聚抗体具有 5 个氨基酸序列如 SEQ ID No :2 所示的单体。

6. 构建权利要求 4 或 5 所述的五聚抗体的方法,其特征在于所述方法包括下列步骤:

- 1) 将权利要求 2 或 3 所述的单域抗体的基因片段亚克隆到含有志贺氏毒素 B 亚基基因片段的五聚体载体中以获得重组载体,和

- 2) 表达所述重组载体,

其中所述含有志贺氏毒素 B 亚基基因片段的五聚体载体优选是 pVT2。

7. 权利要求 2 或 3 所述的单域抗体或权利要求 4 或 5 所述的五聚抗体用于捕获禽流感病毒颗粒的应用。

8. 对禽流感病毒具有特异结合能力的磁性五聚抗体,其特征在于所述磁性五聚抗体通过使权利要求 4 或 5 的五聚抗体与磁性纳米颗粒偶联形成。

9. 检测禽流感病毒的试剂盒,其包括

- 1) 权利要求 8 所述的磁性五聚抗体;
- 2) 与金纳米颗粒偶联的抗禽流感抗体;和
- 3) 对苯二酚。

10. 检测禽流感病毒的方法,其特征在于所述方法包括以下步骤:

- 1) 向样品和空白对照中分别加入权利要求 8 的磁性五聚抗体并利用磁性进行分离,以获得具有磁性的被分离物,

- 2) 向步骤 1) 中获得的被分离物中加入与金纳米颗粒偶联的抗禽流感抗体并利用磁性进行分离,以获得具有磁性的被分离物,

- 3) 向步骤 2) 中获得的被分离物中加入对苯二酚并在 390nm 处测量其光吸收值,和

- 4) 通过对所述样品获得的 390nm 处的光吸收值大于对所述空白对照获得的 390nm 处的光吸收值,确定所述样品中具有禽流感病毒。

11. 权利要求 8 所述的磁性五聚抗体和权利要求 9 所述的试剂盒用于检测禽流感病毒的应用。

禽流感病毒单域抗体、五聚抗体及其制备和应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学和抗体工程技术领域。具体地说,本发明是一类源于羊驼的新型抗体及经过改造后将其应用于禽流感病毒诊断的生物传感器方法。

背景技术

[0002] 流感已经逐渐成为威胁人类健康的主要疾病之一。2009年甲型H1N1流感病毒在全球范围内的爆发以及2003年以来高致病性禽流感H5N1给人们带来的恐慌促使人们不断提高应对流感病毒的诊断和治疗能力。在病毒感染早期进行诊断有利于提高治愈率,减少病毒传播。对于流感病毒的检测,除了传统的检测方法如病毒分离、RT-PCR等,特异性抗体也广泛地用于各种ELISA及免疫荧光等检测方法中。此外,也有很多提高检测特异性及灵敏度的尝试,例如开发特异性更强的抗体,在检测系统中引入微球体等。尽管如此,开发基于抗体的高灵敏度流感病毒检测方法仍然面临着巨大的挑战,也有很大的空间去探索。

发明内容

[0003] 本发明的特色在于它是利用基因工程的方法获得的对于禽流感病毒高亲和的五聚抗体及其应用在基于磁性纳米颗粒的生物传感器中进行禽流感病毒的检测。本发明的理论根据是基于骆驼抗体的特殊性质:骆驼血清中有近一半的IgG由重链抗体组成,并且可以功能性的结合抗原;同样缺失轻链的抗体——新抗原受体(NARs)在鲨鱼体内发现。由此克隆构建的只含重链可变区的抗体称为单域抗体,即VHH抗体,分子量仅为15kD,可以结合一些更小的抗原表位,有更高的结合活性。此小分子抗体通过噬菌体展示技术从预先建立好的单域抗体库中筛选得到,并亚克隆于表达载体中,通过转化大肠杆菌大量表达。单域抗体仅仅由重链可变区便可以发挥结合抗原的功能,并显示出可比拟的亲合力。此外,由于骆驼抗体中天然存在不含有轻链的重链抗体,其可变区的几个关键氨基酸由传统抗体中的疏水突变为亲水氨基酸,因此源于骆驼天然重链抗体的单域抗体具有以下三个显著特点:1、具有和传统抗体相比拟的亲合力;2、原核表达时可溶性非常强,表达量较高;3、分子量更小,更易于进行基因工程操作。这就弥补了传统小分子抗体的致命弱点,为基因工程抗体的发展拓展出广阔的空间。因此,与传统的鼠源单克隆抗体相比,利用噬菌体展示技术制备单域抗体所需时间周期更短,工作量更小,且由于可以用大肠杆菌表达,产量也大大提高。

[0004] 基于上述理论基础,首先,我们利用流感病毒免疫羊驼,建立了流感病毒免疫单域抗体噬菌体库,并利用纯化的灭活流感病毒从抗体库中筛选出一株高亲和的单域抗体VHH3B。为了提高该抗体对禽流感病毒的亲合力,使之更适用于高灵敏度检测,我们又将单域抗体VHH3B与志贺氏毒素B亚基进行融合表达,通过志贺氏毒素B亚基自身的五聚化使得表达产物五聚化,形成五聚抗体。最后利用磁性纳米颗粒偶联的五聚抗体捕获样本中的病毒,再以胶体金颗粒偶联的鼠源禽流感病毒特异性抗体3C8为检测抗体,通过这样的组合,建立起高灵敏的生物传感器方法,进行病毒的高灵敏度检测。

[0005] 本发明在技术路线方面的创新之处在于:1、利用灭活禽流感H5N1和H5N2病毒共

同免疫成年羊驼,经过三次加强免疫后,分离 B 细胞建立免疫羊驼单域抗体库,并筛选出禽流感特异的高亲和力单域抗体;2、利用志贺氏毒素 B 亚基自身五聚化的性质,将禽流感单域抗体与之融合表达,形成禽流感病毒特异性的五聚抗体。五聚后的抗体表现出更高的亲和力,更适用于禽流感病毒的高灵敏度检测的需要。3、利用磁性纳米颗粒偶联的五聚抗体作为捕获抗体和胶体金颗粒偶联的鼠源抗禽流感单抗进行禽流感病毒的检测。4、利用金催化的对苯二酚氧化生成苯醌的反应作为检测结果的反映。

[0006] 具体内容如下:

[0007] 1. 获得对禽流感病毒具有特异结合能力的单域抗体的方法,其特征在于所述方法包括下列步骤:

[0008] 1) 建立禽流感病毒免疫单域抗体噬菌体库,和

[0009] 2) 利用噬菌体展示技术从所述单域抗体噬菌体库中筛选对禽流感病毒亲和力高的单域抗体克隆,

[0010] 其中,优选地,所述禽流感病毒是流感疫苗 H5N1 亚型 Re1 株和 H5N2 亚型 N28 株。

[0011] 2. 一种对禽流感病毒具有特异结合能力的单域抗体,其特征在于所述单域抗体是通过以上 1 的方法获得的。

[0012] 3. 一种对禽流感病毒具有特异结合能力的单域抗体,其特征在于所述单域抗体的氨基酸序列如 SEQ ID No :1 所示。

[0013] 4. 一种对禽流感病毒具有特异结合能力的五聚抗体,其特征在于所述五聚抗体是由以上 2 或 3 所述的单域抗体通过五聚体核心形成的五聚抗体,其中所述五聚体核心可以是含有志贺氏毒素 B 亚基基因片段的五聚体载体,优选是 pVT2。

[0014] 5. 以上 4 所述的五聚抗体,其特征在于所述五聚抗体具有 5 个氨基酸序列如 SEQ ID No :2 所示的单体。

[0015] 6. 构建以上 4 或 5 所述的五聚抗体的方法,其特征在于所述方法包括下列步骤:

[0016] 1) 将以上 2 或 3 所述的单域抗体的基因片段亚克隆到含有志贺氏毒素 B 亚基基因片段的五聚体载体中以获得重组载体,和

[0017] 2) 表达所述重组载体,

[0018] 其中所述含有志贺氏毒素 B 亚基基因片段的五聚体载体优选是 pVT2。

[0019] 7. 以上 2 或 3 所述的单域抗体或以上 4 或 5 所述的五聚抗体用于捕获禽流感病毒颗粒的应用。

[0020] 8. 对禽流感病毒具有特异结合能力的磁性五聚抗体,其特征在于所述磁性五聚抗体通过使以上 4 或 5 的五聚抗体与磁性纳米颗粒偶联形成。

[0021] 9. 检测禽流感病毒的试剂盒,其包括

[0022] 1) 以上 8 所述的磁性五聚抗体;

[0023] 2) 与金纳米颗粒偶联的抗禽流感抗体;和

[0024] 3) 对苯二酚。

[0025] 10. 检测禽流感病毒的方法,其特征在于所述方法包括以下步骤:

[0026] 1) 向样品和空白对照中分别加入以上 8 的磁性五聚抗体并利用磁性进行分离,以获得具有磁性的被分离物,

[0027] 2) 向步骤 1) 中获得的被分离物中加入与金纳米颗粒偶联的抗禽流感抗体并利用

磁性进行分离,以获得具有磁性的被分离物

[0028] 3) 向步骤2)中获得的被分离物中加入对苯二酚并在390nm处测量其光吸收值,和

[0029] 4) 通过对所述样品获得的390nm处的光吸收值大于对所述空白对照获得的390nm处的光吸收值,确定所述样品中具有禽流感病毒。

[0030] 11. 以上8所述的磁性五聚抗体和以上9所述的试剂盒用于检测禽流感病毒的应用。

[0031] 附图简述

[0032] 图1. 禽流感病毒抗体库经四轮筛选富集数计算;

[0033] 图2. SDS-PAGE分析抗禽流感病毒单域抗体的纯度,其中左侧泳道:蛋白质分子量标准;右侧泳道:纯化的抗禽流感病毒单域抗体;

[0034] 图3. 抗禽流感病毒单域抗体结合特异性;

[0035] 图4. 表面等离子共振技术分析单域抗体的结合能力;

[0036] 图5. SDS-PAGE分析抗禽流感病毒五聚体抗体的纯度,其中左侧泳道:蛋白质分子量标准;右侧泳道:纯化的抗禽流感病毒五聚体抗体;

[0037] 图6. 抗禽流感病毒五聚体抗体结合特异性;

[0038] 图7. 表面等离子共振技术分析五聚体抗体的结合能力;

[0039] 图8. 基于磁性纳米颗粒的生物传感器检测禽流感病毒;

[0040] 图9. 双抗夹心ELISA检测禽流感病毒;

[0041] 图10. 噬菌粒载体pCANTAB5E图谱;

[0042] 图11. 表达载体pET28a图谱;和

[0043] 图12. 五聚体载体pVT2序列图谱。

[0044] 序列说明

[0045] SEQ ID No :1 单域抗体VHH3B的氨基酸序列;和

[0046] SEQ ID No :2 五聚抗体pVHH3B的单体的氨基酸序列。

具体实施方式

[0047] 为了更全面地理解和应用本发明,提供下列实施例。

[0048] 实施例一:单域抗体的制备和鉴定

[0049] 应用噬菌体展示技术生产单域抗体VHH3B(Arbabi Ghahroudi and Muyldermans, Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies, FEBS Letters, 1997)。简述如下:利用商品化的禽流感疫苗H5N1亚型Re1株(商购自北京兽医总站)和H5N2亚型N28株(商购自北京兽医总站)对两只成年羊驼(Alpaca, 骆驼科, 美洲驼属, 购自中华羊驼养殖基地, Vicugna pacos)(代号分别为B007和B008)进行颈部两侧淋巴结皮下多点免疫接种,每隔10天免疫一次,共分三次。最后一次免疫接种后10天分别取两只羊驼的外周血,用红细胞裂解液(商购自天根生化科技(北京)有限公司)裂解血细胞,离心收集白细胞。加入1ml Trizol(商购自Invitrogen),室温静置5min。加入200 μ l 氯仿静置2-3min。12000rpm, 4 $^{\circ}$ C离心15min。转移上层水相到另一新离心管内,加入500 μ l 异丙醇充分混匀后-20 $^{\circ}$ C静置10min, 12000rpm 4 $^{\circ}$ C离心10min后,弃上清。沉淀RNA用1ml 75%乙醇漂洗2-3次, 4 $^{\circ}$ C 7500rpm离心5min, 弃上清。

RNA 沉淀室温干燥 5-10min,用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的超纯水 50 μ l 于 55 $^{\circ}$ C 温育 10min 完全溶解 RNA。

[0050] 以 RNA 为模板反转录合成 cDNA (Invitrogen 试剂盒,反应条件:加 RNA 2 μ g, 20 μ M oligo dT 3 μ l, 10 μ M dNTP 1 μ l 于 PCR 管中,加水至 13 μ l。65 $^{\circ}$ C 孵育 5min,迅速置冰上 2-3min。加入 5 \times buffer 4 μ l, 100mM DTT 1 μ l, 反转录酶 SSIII RT 1 μ l, RNase 抑制剂 HRPI 1 μ l 混合均匀。50 $^{\circ}$ C 1h, 75 $^{\circ}$ C 15min)。以 cDNA 产物为模板,先后用表 1 中的两对引物 VHBACKA6, CH2FORA4 和 F-PRCCAMEL, R-PRCCAMEL 进行巢式 PCR (反应条件:94 $^{\circ}$ C, 5min 预变性; 94 $^{\circ}$ C, 30s, 55 $^{\circ}$ C, 30s, 72 $^{\circ}$ C, 40s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min), 扩增出特异的 VHH 片段。

[0051] 表 1 利用巢式 PCR 方法扩增 VHH 片段所用两组引物

[0052]

第一次 PCR	CH2FORA4	5'-CGCCATCAAGGTACCAGTTGA-3'
	VHBACKA6	5'-GATGTCCAGCTGCAGGCGTCTGG(A/G)GGAGG-3'
第二次 PCR (内含 SfiI 位点)	F-PRCCAMEL	5'-CCTTTCTATGCAGGCCCGCCGCGCATGGCCGA(G/T)GT(G/C)CAGCT-3' (SfiI)
	R-PRCCAMEL	5'-GGCCGCAAGGCCTCGGGGGCCTGAGGAGACGGTGACCTG-3' (SfiI)

[0053] 然后将扩增出的 VHH 片段与噬菌粒载体 pCANTAB5E (商购自 Amersham Pharmacia, 如图 10 所示) 分别用限制性内切酶 SfiI 在 50 $^{\circ}$ C 水浴中酶切,回收切割后的 VHH 片段和载体片段后,用 T4DNA 连接酶 (商购自 TaKaRa) 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。之后,电转化连接产物入大肠杆菌 (E. Coli), 具体方法如下:将连接产物用 PCR 纯化试剂盒 (商购自天根生化科技 (北京) 有限公司) 去除离子,加入到事先准备好的感受态细胞大肠杆菌 TG1 中 (商购自 Stratagene), 混匀,冰上放置 30min。加至预冷的电转杯 (1mm, BioRad) 中,在电压 2.5kV, 电阻 2000 Ω , 电容 25 μ F 的条件下进行电穿孔转化。之后迅速加入到 2 \times YT-AG 培养基 (1.6% 胰蛋白胨, 1% 酵母提取物, 0.5% 氯化钠, 氨苄青霉素至终浓度为 100 μ g/ml, 卡那霉素至终浓度 50 μ g/ml, 2% 葡萄糖) 中, 180rpm, 37 $^{\circ}$ C, 培养 1h。5000g, 10 分钟离心, 适量 2 \times YT 重悬沉淀, 涂于 SOB-AG 固体培养基 (2% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 0.05% 氯化钠, 1% 琼脂糖, 氨苄青霉素至终浓度为 100 μ g/ml, 卡那霉素至终浓度 50 μ g/ml, 2% 葡萄糖) 上, 37 $^{\circ}$ C, 倒置培养过夜。将转化菌从平板上刮下后以 15% 甘油保存于 -70 $^{\circ}$ C。此即为流感病毒纳米抗体基因库, 其大小为 2×10^6 , 冷藏在 -70 $^{\circ}$ C。

[0054] 禽流感病毒特异单域抗体的筛选过程如下:从单域抗体噬菌体抗体库中取出 500 μ l 用于筛选, 首先将其加入 9.5ml 的 2 \times YT 培养基 (1.6% 胰蛋白胨, 1% 酵母提取物, 0.5% 氯化钠, 2% 葡萄糖) 中, 37 $^{\circ}$ C, 220rpm 活化 1h。再加入 10 μ l M13 辅助噬菌体 (商购自 Stratagene), 补加氨苄青霉素, 37 $^{\circ}$ C, 220rpm 培养 2h。5000g, 10min 离心收菌。重悬于 10ml 2 \times YT-AG 培养基中 (A, G 分别代表含有氨苄青霉素和卡那霉素), 37 $^{\circ}$ C, 220rpm, 过夜培养。离心过夜培养物, 将上清用 PEG/NaCl 沉淀 1h, 10000g, 4 $^{\circ}$ C 离心 20min, 沉淀即为噬菌体抗体。2% BSA 重悬沉淀, 加入事先用灭活禽流感病毒 (禽流感病毒 A/Chicken/

Henan/16/2004(H5N1),购自中国科学院武汉病毒所)包被,并用2%BSA充分封闭的免疫管中,37℃孵育2h。再先后用PBST和PBS吹洗以除去非特异吸附,加入2.5ml洗脱液(0.1M Gly-HCl,pH 2.2)室温孵育10min以破坏抗原抗体间的相互作用力。吹打数次后吸至另一干净管内,立即用60μl 2M Tris(pH7.4)中和。将洗脱液加入至10ml OD600 = 0.3的大肠杆菌TG1(商购自Stratagene)菌液中,室温静置15min,使噬菌体充分侵染大肠杆菌。这样完成第一轮筛选,并从中吸取少量菌液涂布SOB-AG平板(2%胰蛋白胨,0.5%酵母提取物,0.05%氯化钠,氨苄青霉素至终浓度为100μg/ml,卡那霉素至终浓度50μg/ml,2%葡萄糖)计数。重复以上步骤,又进行了3轮的筛选和富集,每次用PBST和PBS吹洗的次数和力度不断加大(图1)。

[0055] 在最后一轮筛选完成后,从筛选后涂布的平板上随机挑取46个克隆,按照上述方法分别制备噬菌体抗体。再利用直接ELISA进行噬菌体抗体的筛选,具体方法如下:用禽流感H5N1亚型病毒包被ELISA板,4℃包被过夜;加2%BSA室温封闭2h;用2%BSA重悬的噬菌体抗体作为一抗,37℃孵育1h;二抗为Anti-M13-HRP(商购自Promega),37℃孵育40min。最后邻苯二胺(OPD)底物显色(商购自上海生工生物工程公司),显色5min后用2M H₂SO₄终止反应,酶标仪在OD/490nm读数。通过此方法筛选出一株对禽流感H5N1亚型病毒高亲和力的克隆,命名为VHH3B。VHH3B由120个氨基酸组成,其序列如SEQ ID No:1所示。

[0056] 为了大量获得禽流感病毒特异单域抗体VHH3B,我们将其基因片段通过表2中的引物,亚克隆入表达载体pET28a(商购自Novagen,如图11所示),并在大肠杆菌BL21(DE3)(商购自Novagen)中获得大量表达(图2),与其它基因工程抗体相比,其可溶性非常强,表达量也可以达到每升菌10mg。经过直接ELISA分析,原核表达的单域抗体VHH3B表现出对禽流感病毒的强结合力,而对其它无关抗原没有结合力(图3)。经过SPR(Surface Plasmon Resonance)对VHH3B进行抗体的动力学分析(Jianbing Zhang, et al., Pentamerization of Single-domain Antibodies from Phage Libraries: A Novel Strategy for the Rapid Generation of High-avidity Antibody Reagents, J. Mol. Biol. (2004) 335, 49-56),得知其亲和力常数KD为 2.66×10^{-7} nm(图4),作为一株基因工程抗体,其亲和力可以和一株鼠源单克隆抗体相比拟,非常有利于其进一步的应用。

[0057] 表2 VHH3B 亚克隆入 pET28a 所用引物

[0058]

FpET (含 <i>Bam</i> HI 位点)	5'-CGGGATCCATGGCC GAGGTCCAGCTGC-3'
RpET (含 <i>Xho</i> I 位点)	5'-CCGCTCGAGTGAGGAGACGGTG ACCTGGGTC-3

[0059] 实施例二:禽流感病毒五聚体抗体 pVHH3B 的制备

[0060] 我们最终需要获得一个高亲和力的抗体用于禽流感病毒的检测和治疗,因此我们将VHH3B基因片段通过表3中的引物亚克隆入五聚载体pVT2(由加拿大National Research Council 张剑冰博士提供,如图12所示,参考文献:Jianbing Zhang, et al., Pentamerization of Single-domain Antibodies from Phage Libraries: A Novel Strategy for the Rapid Generation of High-avidity Antibody Reagents, J. Mol. Biol. (2004) 335, 49-56)中。由于该载体中的志贺氏毒素B亚基可以自身五聚化,所以与志贺氏毒素B亚基融合表达单域抗体VHH3B后,形成五聚抗体结构,我们命名其为pVHH3B。pVHH3B

的单体由 195 个氨基酸组成,其序列如 SEQ ID No :2 所示。随后我们将其在大肠杆菌 TG1 中大量表达 (图 5),并通过 ELISA 鉴定其与禽流感病毒结合的特异性 (图 6),通过 SPR 分析, pVHH3B 显示出比 VHH3B 更强的亲和力 (图 7)。

[0061] 表 3VHH3B 亚克隆入 pVT2 所用引物

[0062]

FpVT (含 <i>BspEI</i> 位点)	5'-CGCCATCAAGGTACCAGTTGA-3'
RpVT (含 <i>BamHI</i> 位点)	5'-GATGTCCAGCTGCAGGCGTCTGG(A/G)GGAGG-3'

[0063] 实施例三:用磁性纳米颗粒偶联的禽流感病毒特异五聚抗体和金纳米颗粒偶联的鼠源禽流感病毒特异单抗建立生物传感器方法检测禽流感病毒

[0064] 我们将 1 μ m 二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒 (MNPs) (商购自天津倍思乐色谱技术开发中心) 偶联五聚抗体 pVHH3B, 形成 MNP-pVHH3B。

[0065] 具体方法如下:取 1ml 10mg/ml 的磁性纳米颗粒,加入 50mg/ml 的琥珀酰亚胺 (NHS, 商购自 Sigma) 和碳二亚胺 (EDC, 商购自 Sigma) 各 50 μ l, 室温孵育 30min, 用去离子水清洗, 除去多余的 NHS/EDC。加入 1ml pH6.0 的乙酸钠, 100 μ g 的 pVHH3B, 混匀, 4℃ 孵育 2h, PBS 洗涤, 加入 50mM pH 7.4 Tris-Cl 封闭活化的羧基, PBS 重悬, 4℃ 保存。同时用鼠单抗 mAb 3C8 (商购自北京万泰制药有限公司) 标记 14nm 金纳米颗粒 (GNPs) (商购自北京万泰制药有限公司)。具体方法如下:取 1ml 金纳米颗粒, 用 25mM K₂CO₃ 调 pH 至 8.5, 加入 10 μ l, 1mg/ml 的 3C8, 混匀, 室温静置 10min。加入 100 μ l 10% BSA, 混匀, 室温静置 10min, 10000rpm 离心 20min, 吸除上清。用 50 μ l PBS 重悬金纳米颗粒沉淀, 4℃ 保存。首先用 MNP-pVHH3B 捕获流感病毒颗粒, 将带有病毒颗粒的 MNPs 用磁铁从溶液中分离之后, 向其中加入与金纳米颗粒偶联的 mAb 3C8, 加入的与金纳米颗粒偶联的 mAb 3C8 通过结合流感病毒颗粒而与磁性纳米颗粒形成复合体, 将此复合体用磁铁分离。向其中加入对苯二酚, 由于所述复合物中的金催化对苯二酚氧化, 生成苯醌。所以通过将加入流感病毒颗粒时苯醌在 390nm 处的光吸收值与未加入病毒颗粒时的光吸收值作比较, 实现对病毒的高灵敏度检测。通过此方法对流感病毒进行检测, 可以检测到低至 10ng/ml 水平的流感病毒 (图 8), 与双抗夹心 ELISA 比较, 灵敏度提高了 10 倍 (图 9)。

IB101881.ST25.txt

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 禽流感病毒单域抗体、五聚抗体及其制备和应用

<130>IB101881

<160>2

<170>PatentIn version 3.1

<210>1

<211>118

<212>PRT

<213>Vicugna pacos

<400>1

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

<210>2

<211>195

<212>PRT

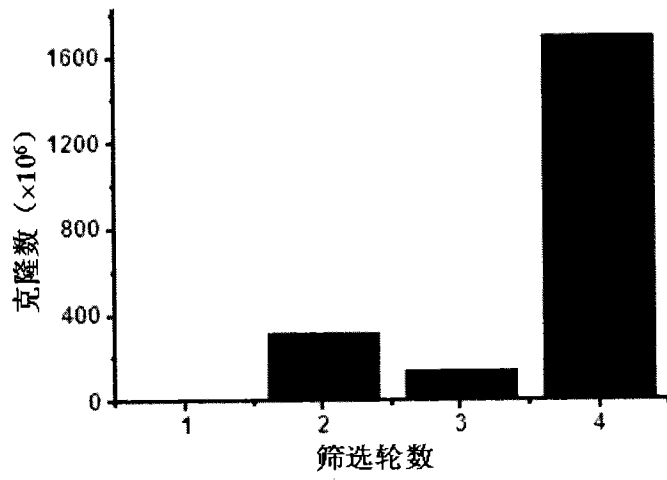


图 1

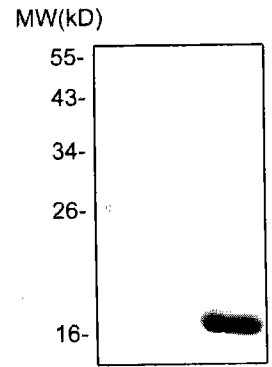


图 2

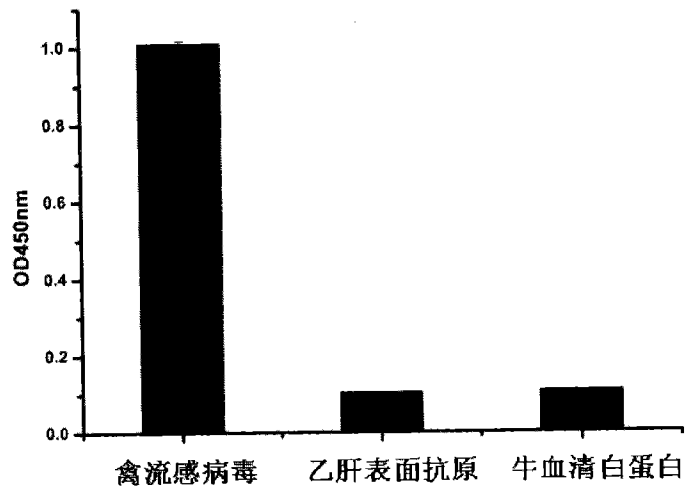


图 3

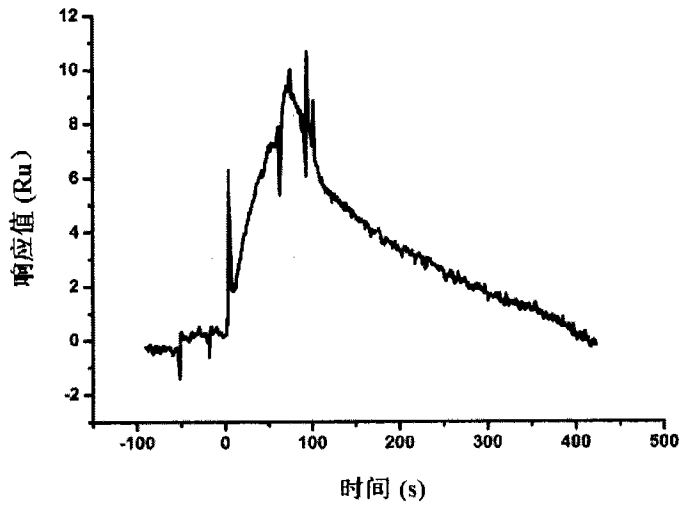


图 4

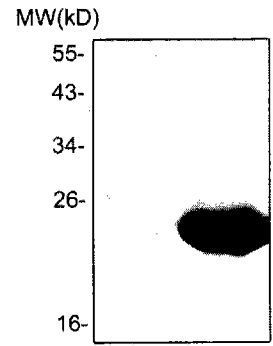


图 5

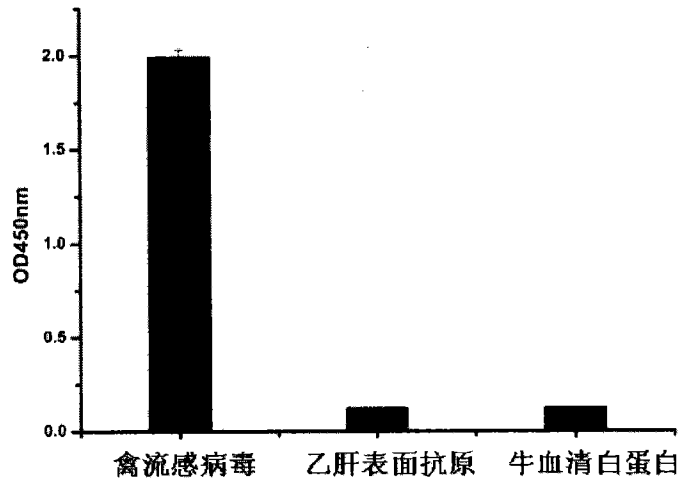


图 6

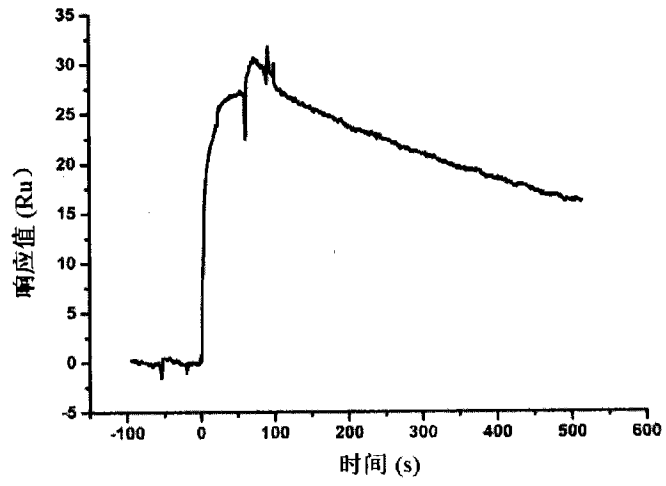


图 7

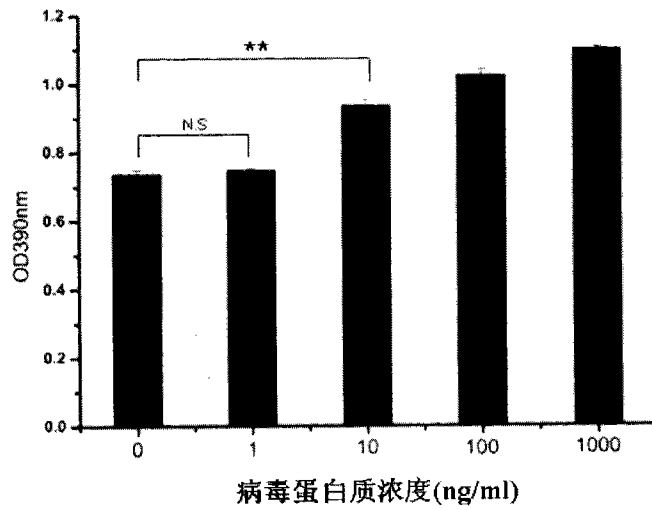


图 8

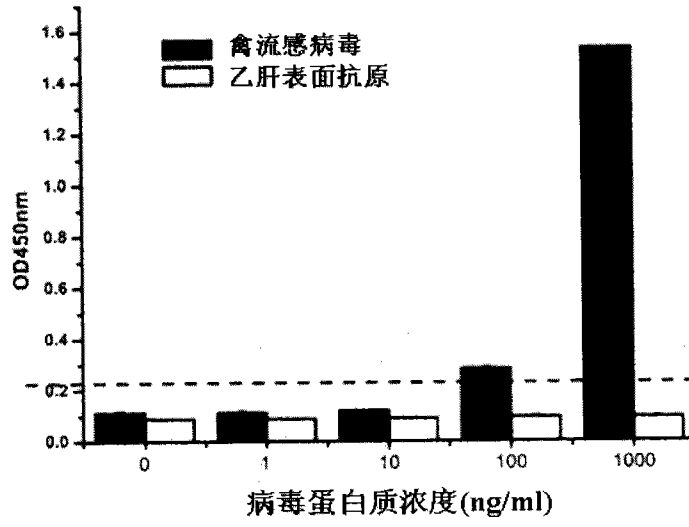
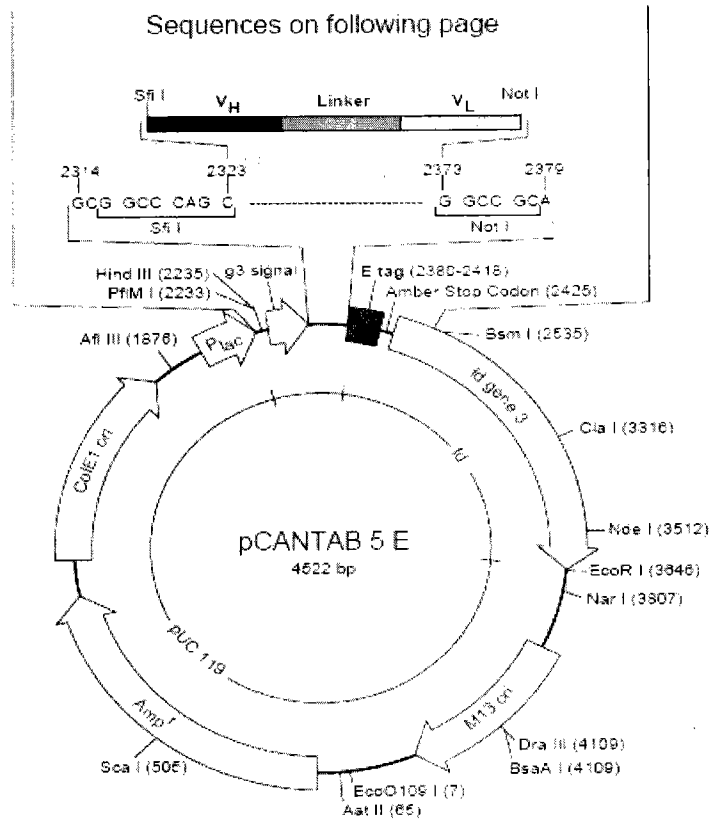


图 9



30

```

2218
pCANTAB5-R1
5' ATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTGGAGATTTT
3' TACTGGTACTAATGCGTTTCGAAACCTCGGAAAAAAACCTCTAAAA

pCANTAB5-S1
CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC AATTTCCTTTAGTTGTTCTTTCTAT
GTTGCACTTTTTAAATAAAGCGTTAAGGAAATCAACAAGGAAAGATA

2314 Sfi I
GCGGCCACGCCGCCNNNNNNNGGGGCCAAGGCCACCGSTCACC
CGCCGGTCCGGCCGNNNNNNNCCCGGTTCCGTGGTGCCAGTGGC
VH

pCANTAB5-S3
TCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGG
AGAGGAGTCCACCTCCGCCAAGTCCGCTCCACCGAGACCGCCACC

pCANTAB5-S4
Linker
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA
GCTTAGCCTGTAGCTCGAGTGTAGTCAAGGTTNNNNNNCGCCGGCGT
Not I 2379
V_L

E tag
GGTGCGCCCGTGGCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCA
CCAGCGGCCACGGCATAGGCCTAGGCGACCTTGCGCACGGCGT

Amber Stop Codon
TAGACTGTTGAAAGTGTTTAGCAAACCTCATACAGAAAATTCATTTAC
ATCTGCAACCTTCAACAAATCGTTTTGGAGTATGCTTTTAAAGTAAATG
pCANTAB5-S6 2521
TAACGCTCGAAAAGACGACAAAACCTTAGATCGTTACGCTAACTATG 3'
ATTGCAGACCTTTCTGCTGTTTGAATCTAGCAATGCGATTGATAC 5'
pCANTAB5-R2
    
```

pCANTAB 5 E map on previous page

图 10

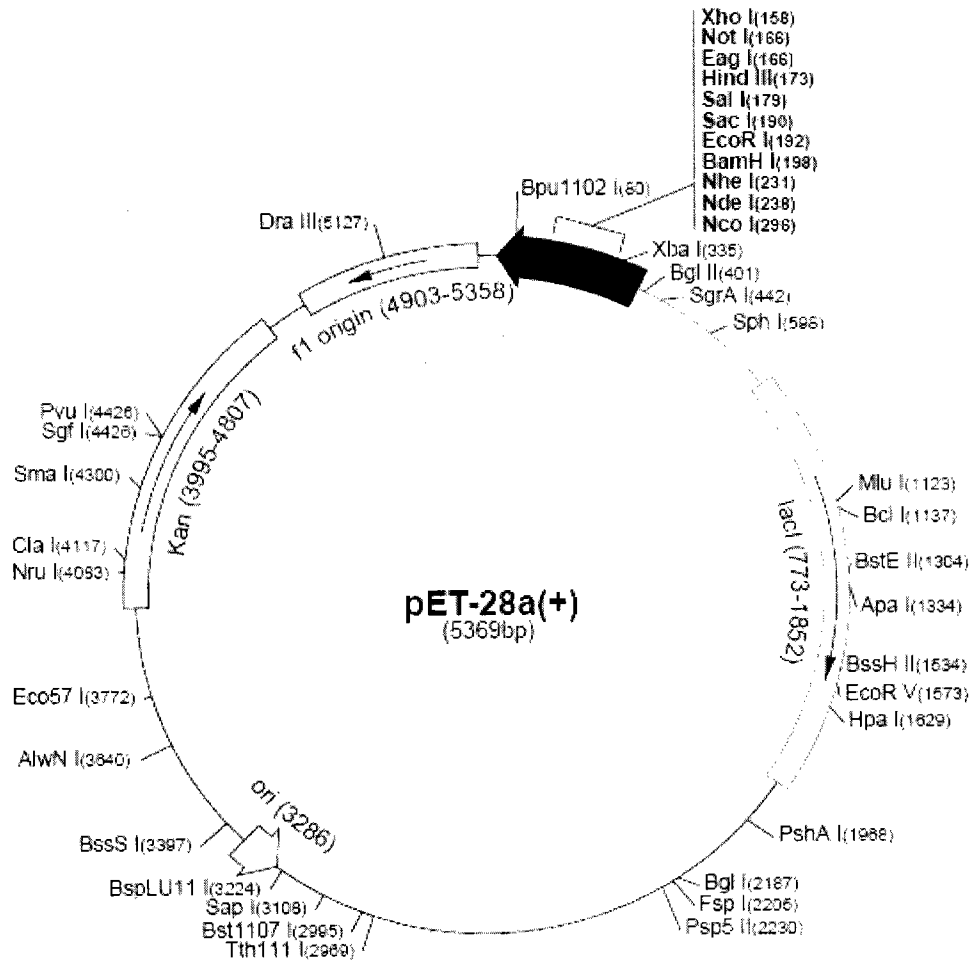


图 11

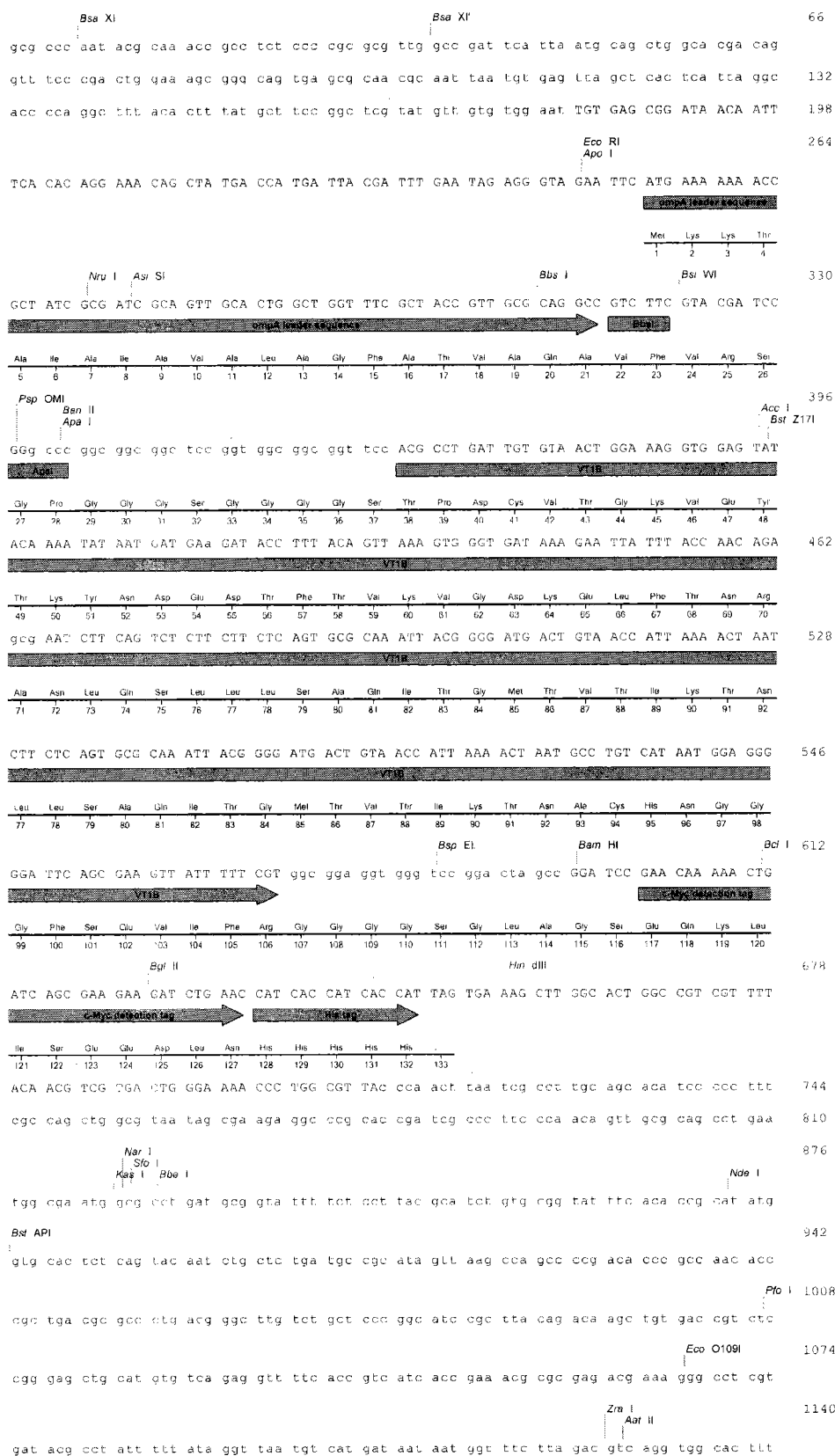


图 12

cot att ttt ata ggt taa tgt cat gat aat aat ggt ttc tta gac gtc agg tgg cac ttt tcg ggg 1146
 aaa tgt cgg cgg aac ccc tat ttg ttt att. ttt cta aat aca ttc aaa tat gta tcc gct cat gag 1212
 ana ala acc clq ala aal gct tca ata ata ttg aaa aag gaa gag tat gag tat. tca aca ttt cgg 1278
 tgt cgc cct tat tcc ctt ttt tgc ggc att ttg cct tcc tgt ttt tgc tca ccc aga aac gct ggt 1344
 gaa agt aaa aga tgc tga aga tca gtt ggg tgc acg agt ggg tta cat cga act gga tct caa cag 1410
 cgg taa gat cct tga gag ttt tcg ccc cga aga acg ttt tcc aat gat gag cac ttr taa agt tct 1476
 gct atg tgg cgc ggt att atc cgg tat tga cgc cgg gca aga gca act cgg tcg ccg cat aca cta 1542
 ttc tca gaa tga ctt ggt tga gta ccc acc agt cac aga aaa gca tct tcc gga tgg cat gac agt 1608
 aag aga att atg cag tgc tgc cat aac cat gag tga taa cac tgc ggc caa ctt act tct gac aac 1674
 gat cgg agg acc gaa gga gct aac cgc ttt ttt gca caa cat ggg gga tca tgt aac tcg cct tga 1740
 tgg ttg gga acc gga gct gaa tga agc cat acc aaa cga cga gcg tga cac cac gat gcc tgt agc 1806
 aat ggc aac aac gcl gcg caa act att aac tgg cga acL act tac tct agc ttc cgg gca aca att 1872
 aat aga ctg gat gga ggc gga taa agt tgc agg acc act tct gcg ctu ggc cut tcc ggc tgg ctg 1938
 gtt tat tgc tga taa atc tgg agc cgg tga cgc tgg gtc tcg cgg tat cat tgc agc acc ggg gcc 2004
 aga tgg taa ggc ctc cgg tat cgt agt tat cta oac gac ggg gag tca ggc aac tar gga tga acg 2070
 gac ggg gag tca ggc aac tat gga tga acg aaa tag aca gat cgc tga gat agg tgc ctc act gat 2106
 taa gca ttg gta act gtc aga cca agt tta ctc ata tat act tta gat tga ttt aaa act tca ttt 2172
 tta att taa aag gat cta ggt gaa gat cct ttt tga taa tct cat gac caa aat ccc tta acg tga 2238
 qtt ttc gct cca crg aqc gtc aga ccc cgt aga aaa gat caa agg atc ttc ttg aga tcc ttt ttt 2304
 tct gcg cgt aat ctg ctg ctt gca aac aaa aaa acc acc gct acc agc ggl ggt ttg ttt gnc gga 2370
 tca aga gct aoc aac tct ttt tcc gaa ggt aac tgg ctt cag cag agc gca gat acc aaa tac tgt 2436
 ccl tct agt gta gcr qta gtt agg cca cca ctt caa gaa ctc tgt agc acc gcc tac ata cct cgc 2502
 tct gct aat ccr gtl acc agt ggc tgc tgc cag tgg cga taa gtc glg tct tac cgg gtt gga ctc 2568
 aag acg ata gtt acc gga taa ggc gca gcg gtc ggg ctg aac ggg ggg ttc gtc cac aca gcc caz 2634
 ctt gga cgg aac gac cta cac cga act gag ata cct aca gcg tga gct alq aga aag cgc cac gct 2700
 tcc cga agg gag aaa ggc gga cag gta tcc ggt aag cgg cag ggt cgg aac agg aga gcg cac gag 2766
 gga gcr tcc agg ggg aaa cgc ctg gta tcr tta tag tcc tgt agg gtl trg rca cct crg act tga 2832
 gcg tcg att ttt gtc acg ctc gtc agg ggg gcg gag cct atq gaa aaa cgc cag caa cag cgg cct 2898
 ttt tac ggt tcn tgg cct ttt gct ggc ctc ttg ccc aca tgt tct ttc ctg cgt tat ccc ctg att 2964
 ctg tgg ata acc gla tta cgg cct ttg agt gag ctg ata ccg ctc gcc gca gcc gaa cga cgg agc 3030
 goa gcg agt cag tga gcg agg aag cgg aag a 3061

图 12(续)