



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113201069 A

(43) 申请公布日 2021.08.03

(21) 申请号 202110524465.7

(22) 申请日 2021.05.13

(71) 申请人 南华大学

地址 421001 湖南省衡阳市蒸湘区常胜西路28号

(72) 发明人 容益康 吴靖 李凯丽

(74) 专利代理机构 衡阳雁城专利代理事务所
(普通合伙) 43231

代理人 陈纪文

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

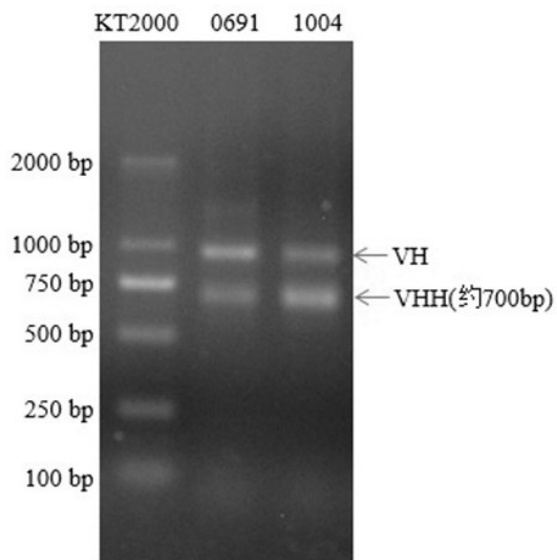
权利要求书1页 说明书8页
序列表8页 附图4页

(54) 发明名称

mcherry或mEOS纳米抗体及其制备方法和应用

(57) 摘要

mcherry或mEOS纳米抗体及其制备方法和应用,涉及生物工程技术领域,本发明通过构建mcherry或mEOS纳米抗体文库,筛选出了特异的阳性单克隆纳米抗体,并检测出了能够与mcherry蛋白结合的一种mcherry纳米抗体,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3所示,以及能够与mEOS蛋白结合的七种mEOS纳米抗体,其核苷酸序列如SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17所示。本发明构建的mcherry或mEOS纳米抗体,相对传统抗体而言可提高产量、降低成本,并获得更好的稳定性。



1. mcherry或mEOS纳米抗体的编码基因,其特征在于:所述mcherry纳米抗体包括两种编码基因,其核苷酸序列分别如序列SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3所示;所述mEOS纳米抗体包括七种编码基因,其核苷酸序列分别如序列SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17所示。

2. mcherry纳米抗体,其特征在于:包括两种mcherry纳米抗体,其氨基酸序列分别如序列SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4所示。

3. mEOS纳米抗体,其特征在于:包括七种mEOS纳米抗体,其氨基酸序列分别如序列SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.18所示。

4. mcherry纳米抗体的表达载体,其特征在于:所述表达载体包括两种mcherry纳米抗体的表达载体,其分别含有权利要求1所述的两种mcherry纳米抗体的编码基因。

5. mEOS纳米抗体的表达载体,其特征在于:所述表达载体包括七种mEOS纳米抗体的表达载体,其分别含有权利要求1所述的七种mEOS纳米抗体的编码基因。

6. 根据权利要求4或5所述的mcherry纳米抗体的表达载体或mEOS纳米抗体的表达载体,其特征在于:所述表达载体为大肠杆菌质粒表达载体或pADL-10b。

7. 与权利要求2或3所述的mcherry纳米抗体或mEOS纳米抗体相关的生物材料,其特征在于:所述生物材料为(a1)至(a8)中的任一种:

(a1) 编码权利要求2或3所述的mcherry纳米抗体或mEOS纳米抗体的核酸分子;

(a2) 含有(a1)所述核酸分子的表达盒;

(a3) 含有(a1)所述核酸分子的重组载体;

(a4) 含有(a2)所述表达盒的重组载体;

(a5) 含有(a1)所述核酸分子的转基因动物细胞系;

(a6) 含有(a2)所述表达盒的转基因动物细胞系;

(a7) 含有(a3)所述重组载体的转基因动物细胞系;

(a8) 含有(a4)所述重组载体的转基因动物细胞系。

8. 一种衍生抗体,其特征在于,所述衍生抗体为下述A)或B)或C)或D)或E):

A) 含有权利要求2或3所述纳米抗体的单链抗体;

B) 含有A)所述单链抗体的融合抗体;

C) 含有权利要求2或3所述纳米抗体的融合抗体;

D) 含有权利要求2或3所述纳米抗体的Fab;

E) 含有权利要求2或3所述纳米抗体的完整抗体。

9. 根据权利要求2或3所述的mcherry纳米抗体或mEOS纳米抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:构建mcherry纳米抗体文库或mEOS纳米抗体文库然后进行筛选,富集能结合抗原的抗体文库,再通过ELISA测定方法继续从能结合抗原的抗体文库中筛选出特异的阳性单克隆纳米抗体,最后通过Native binding检测出能够与mcherry蛋白结合的mcherry纳米抗体或能够与mEOS蛋白结合的mEOS纳米抗体。

10. 权利要求2或3所述的mcherry纳米抗体或mEOS纳米抗体在制备蛋白质标签中的应用。

mcherry或mEOS纳米抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程技术领域,尤其指一种mcherry或mEOS纳米抗体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] mcherry是一种被广泛用于生物技术作为示踪剂的单体红色荧光蛋白分子,包括分子的标记和细胞组分的定位等。因为其颜色和单体分子的光稳定性,在生物医学研究领域,将其用作蛋白质标签比其它荧光蛋白标签更优异。

[0003] mEOS是一种光激活的绿色到红色的荧光蛋白分子。mEOS可发出强烈的绿色荧光,在390 nm的紫外线照射下不可逆地转变为红色。在生物医学研究领域通常用作蛋白质标签,用于蛋白的多色标记,对蛋白质进行定位标记,追踪活细胞内蛋白质运动。

[0004] 传统的mcherry抗体和mEOS抗体均是通过免疫动物所获得,成本高而产量低,并且批次之间稳定性较差,传统抗体结构为两条重链、两条轻链组成的四聚体,其酸碱稳定性差,易变性。

[0005] 纳米抗体是克隆重链抗体的可变区得到的只由一个重链可变区组成的单域抗体,重链抗体(HCAb)存在于骆驼等驼类血清中,天然的缺失轻链及常规抗体重链恒定区 CH1,于1993 年被Hamers 等首次报道,纳米抗体晶体结构直径 2.5 nm、长 4 nm,分子量非常小。与常规抗体相比,纳米抗体有诸多优点,制备纳米抗体将会是解决传统抗体缺点过多的有效手段之一。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种mcherry或mEOS纳米抗体,以提高产量、降低成本,并获得相较于传统抗体更好的稳定性。

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:mcherry或mEOS纳米抗体,所述mcherry纳米抗体包括两种编码基因,其核苷酸序列分别如序列表SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3所示;所述mEOS纳米抗体包括七种编码基因,其核苷酸序列分别如序列表SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17所示。

[0008] 另外,本发明还提供两种mcherry纳米抗体,其氨基酸序列分别如序列表SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4所示。

[0009] 以及还提供七种mEOS纳米抗体,其氨基酸序列分别如序列表SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.18所示。

[0010] 同时还提供mcherry纳米抗体的表达载体,其表达载体包括两种mcherry纳米抗体的表达载体,其分别含有上述的两种mcherry纳米抗体的编码基因;以及还提供mEOS纳米抗体的表达载体,其表达载体包括七种mEOS纳米抗体的表达载体,其分别含有上述的七种mEOS纳米抗体的编码基因。

[0011] 进一步,所述表达载体为大肠杆菌质粒表达载体或pADL-10b。

[0012] 与上述的mcherry纳米抗体或mEOS纳米抗体相关的生物材料,该生物材料为(a1)至(a8)中的任一种:

(a1) 编码权利要求7 或8所述的mcherry纳米抗体或mEOS纳米抗体的核酸分子;

(a2) 含有(a1)所述核酸分子的表达盒。

[0013] (a3) 含有(a1)所述核酸分子的重组载体。

[0014] (a4) 含有(a2)所述表达盒的重组载体。

[0015] (a5) 含有(a1)所述核酸分子的转基因动物细胞系。

[0016] (a6) 含有(a2)所述表达盒的转基因动物细胞系。

[0017] (a7) 含有(a3)所述重组载体的转基因动物细胞系。

[0018] (a8) 含有(a4)所述重组载体的转基因动物细胞系。

[0019] 除此之外,还提供一种衍生抗体,所述衍生抗体为下述A)或B)或C)或D)或E):

A) 含有权利要求2或3所述纳米抗体的单链抗体;

B) 含有A)所述单链抗体的融合抗体;

C) 含有权利要求2或3所述纳米抗体的融合抗体;

D) 含有权利要求2或3所述纳米抗体的Fab;

E) 含有权利要求2或3所述纳米抗体的完整抗体。

[0020] 本发明还提供一种mcherry纳米抗体或mEOS纳米抗体的制备方法,其包括以下步骤:构建mcherry纳米抗体文库或mEOS纳米抗体文库然后进行筛选,富集能结合抗原的抗体文库,再通过ELISA测定方法继续从能结合抗原的抗体文库中筛选出特异的阳性单克隆纳米抗体,最后通过Native binding检测出能够与mcherry蛋白结合的mcherry纳米抗体或能够与mEOS蛋白结合的mEOS纳米抗体。

[0021] 优选地,从大肠杆菌表达的mcherry蛋白或mEOS蛋白克隆获得mcherry纳米抗体文库或mEOS纳米抗体文库。

[0022] 更优选地,从大肠杆菌表达的mcherry蛋白或mEOS蛋白克隆获得mcherry纳米抗体文库或mEOS纳米抗体文库时,用PCR进行第一轮扩增的引物为:上游引物为:GGTGGTCCTGGCTGC;下游引物为:GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC。

[0023] 更优选地,以所述第一轮扩增的引物为模板进行第二轮PCR扩增得到的引物为:

上游引物:

CTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG;

下游引物:

GTGTTGGCCTCCCGGGCCGCTGCGCCTGAGGAGACGGTGACCTGGGTCC

更优选地,在构建好的mcherry纳米抗体文库或mEOS纳米抗体文库中挑取单克隆用PCR检测VHH序列插入率,得到的引物为:

CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTA/GCGTAACGATCTAAAGTTTTGTTCG。

[0024] 更优选地,通过噬菌体展示技术进行筛选富集能结合抗原的抗体文库。

[0025] 更优选地,筛选出特异的阳性单克隆纳米抗体后,用PCR扩增再用Hinf1酶切,挑取序列不重复的克隆以进行后续步骤的实验。

[0026] 除此之外,本发明还提供了一种应用,该应用为上述的mcherry纳米抗体或mEOS纳

米抗体在制备蛋白质标签中的应用。

[0027] 本发明提供的mcherry纳米抗体或mEOS纳米抗体相较于传统的mcherry抗体和mEOS抗体而言,分子量更小、穿透力更强、特异性更高、亲和力更强,结构更简单并且稳定性也更好,易于重组和表达,可通过细菌或酵母大量发酵生产,产量高且成本低,将其应用于疾病的诊断和治疗中具有明显的优势。

附图说明

[0028] 图1为实施例中的mcherry纳米抗体文库构建时的第一轮PCR扩增结果示意图;

图2为实施例mcherry纳米抗体文库构建时的第二轮PCR扩增结果示意图;

图3为实施例ELISA筛选特异的阳性单克隆时包被mcherry酶标板显色的示意图;

图4为实施例ELISA筛选特异的阳性单克隆时包被BSA酶标板显色的示意图;

图5为实施例非变性蛋白凝胶电泳中各单克隆的表达上清与mcherry蛋白反应的示意图;

图6为实施例非变性蛋白凝胶电泳中D1、E1、F1、H1单克隆的表达上清与mEOS蛋白反应的示意图;

图7为实施例非变性蛋白凝胶电泳中A2、B9、E8、G2单克隆的表达上清与mEOS蛋白反应的示意图。

具体实施方式

[0029] 为了便于本领域技术人员的理解,下面结合实施例与附图对本发明作进一步的说明,实施方式提及的内容并非对本发明的限定。应当指出的是,若实施例中未对某步骤作特别指明,可以理解为该步骤按照常规实验条件进行操作,或按照制造厂商说明书建议的条件(例如参照PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书步骤进行实验)。

[0030] 本发明以大肠杆菌表达的mcherry蛋白免疫羊驼,构建了免疫后的羊驼纳米抗体文库,并利用噬菌体展示技术从抗体文库中筛选了特异的阳性单克隆纳米抗体,最后检测出能够与mcherry蛋白结合的两个mcherry纳米抗体,分别命名为D10与C1,通过测序获得了这两个mcherry纳米抗体的核苷酸序列,如序列表中SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3所示,其对应的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4所示。

[0031] 同时本发明也以大肠杆菌表达的mEOS蛋白免疫羊驼,构建了免疫后的羊驼纳米抗体文库,并利用噬菌体展示技术从抗体文库中筛选了特异的阳性单克隆纳米抗体,最后检测出能够与mEOS蛋白结合的七个mEOS纳米抗体,分别命名为A2、B9、D1、E1、E8、G2、H1,通过测序获得了这七个mEOS纳米抗体的核苷酸序列,如序列表中SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17所示,其对应的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.18所示。

[0032] 实施例1

mcherry纳米抗体的制备方法,包括以下步骤:

(1) 构建mcherry纳米抗体文库:

(1.1) 免疫使用的蛋白为大肠杆菌表达的mcherry蛋白,首次免疫时,取1mg抗原蛋白(其中有0.25mg mcherry蛋白)与等体积的弗氏完全佐剂震荡混匀乳化后,于羊驼颈部分点注射,总计免疫四次,每两周免疫一次,每次免疫蛋白用量为0.5mg (其中有0.125mg mcherry蛋白),加强免疫所使用的佐剂均为弗氏不完全佐剂。四免后四天左右,采集至少20mL羊驼全血,使用淋巴细胞分离液分离出PBMC。

[0033] (1.2) 提取PBMC的总RNA(利用trizol法)。

[0034] (1.3) 将RNA反转录为cDNA,操作步骤参照PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(购自takara)说明书进行。

[0035] (1.4) 以cDNA为模板进行巢式PCR扩增VHH片段,第一轮PCR的引物为:

上游引物为: GGTGGTCCTGGCTGC;

下游引物为: GGTACGTGCTGTTGAAGTGTCC。

[0036] 退火温度为56℃,循环数为23,可扩增出两个片段,大小分别约为1000bp的VH片段和700bp的VHH片,扩增结果如图1所示,切胶回收700bp大小的VHH基因片段。

[0037] 以第一轮PCR产物为模板进行第二轮PCR,得到的第二轮PCR引物为:

上游引物:

CTCGCGCCAGCCGGCCATGGCGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG;

下游引物:

GTGTTGGCCTCCCGGGCCGCTGCGCCTGAGGAGACGGTGACCTGGGTCC。

[0038] 退火温度为58℃,循环数为12,此次目的片段的大小约为450bp,结果如图2所示,用PCR产物纯化试剂盒纯化此片段。

[0039] (1.5) 用Bg11内切酶酶切回收的目的基因片段及pADL-10b载体,并用T4连接酶连接载体及VHH片段,并将连接产物转化大肠杆菌SS320感受态细胞,即为构建好的mcherry纳米抗体细菌文库,计算得文库库容为 1×10^8 ,挑取24个单克隆用PCR检测VHH序列插入率,引物为:

CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTA/GCGTAACGATCTAAAGTTTTGTCG。

[0040] (2) 筛选mcherry纳米抗体文库:

(2.1) 于5mL免疫管中加入200μg溶解于PBS的 mcherry蛋白,4℃包被过夜,同时设置包被BSA的阴性对照。

[0041] (2.2) 加入2 mL 3%的BSA室温封闭2h,加入500μL噬菌体溶液(噬菌体展示文库效价为 1.48×10^{13} cfu),室温下作用1h。

[0042] (2.3) 用PBST(tween浓度为0.05%)清洗免疫管10次以去除未结合的噬菌体,加入0.25mg/mL trypsin 洗脱30min将与蛋白特异性结合的噬菌体洗脱下来,将噬菌体感染处于对数生长期的大肠杆菌SS320,用于准备下一轮筛选所需要的噬菌体及检测此次筛选的效果。

[0043] (2.4) 以上筛选过程需重复3轮,随着筛选轮数的增加,包被蛋白量应适当减少,清洗条件也应设置更严苛。

[0044] (2.5) 筛选结果表1所示,经过两轮筛选后,能结合抗原的抗体文库得到了富集,可进行后续实验找到结合抗原的单克隆。

| | | | |
|--|----------|-----------|---------|
| | input 效价 | mcherry效价 | BSA对照效价 |
|--|----------|-----------|---------|

| | | | |
|-------|-----------------------|--------------------|-----------------|
| 第一轮筛选 | 1.6×10^{12} | 1.08×10^7 | 1×10^6 |
| 第二轮筛选 | 1.84×10^{10} | 2.4×10^5 | 8×10^3 |
| 第三轮筛选 | 1.16×10^{11} | 1.64×10^9 | 4×10^3 |

[0045] 表1

(3) ELISA筛选特异的阳性单克隆

(3.1) 经过3轮筛选后,挑取96个感染噬菌体的SS320单克隆,接种于200 μ L的2 \times YT培养基(Amp、Tet抗性),达到对数生长期后加入辅助噬菌体M13k07、kana及IPTG,于30 $^{\circ}$ C过夜培养,离心去菌体沉淀,噬菌体上清备用。

[0046] (3.2) 取两块酶标板分别包被mcherry蛋白及BSA蛋白,3%BSA封闭后加入50 μ L噬菌体上清室温下作用1h。

[0047] (3.3) TBST清洗后加入Anti-fd bacteriophage antibody(购自sigma),室温下作用1h。

[0048] (3.4) TBST清洗后加入Goat anti-rabbit IgG HRP conjugated,室温下作用1h。

[0049] (3.5) TBST清洗,加入TMB显色液显色,加入终止液终止反应。

[0050] (3.6) 包被mcherry酶标板显色如图3所示,包被BSA酶标板显色如图4所示,所有克隆显色值均较高,挑取48个单克隆,PCR扩增后用Hinf1酶切,挑取序列不重复的克隆进行后续实验,这些克隆为:A1、D10、C1、D1、B3、E3。

[0051] (4) Native binding 检测nanobody与抗原蛋白结合

(4.1) 挑取A1、D10、C1、D1、B3、E3单克隆于2 \times YT培养基(Amp、Tet抗性),于37 $^{\circ}$ C培养。

[0052] (4.2) OD600达到0.6时,加入IPTG诱导6h。

[0053] (4.3) 离心收取菌体沉淀,加入CelLyticTM B裂解液(购自sigma),室温裂解15min,离心收集上清。

[0054] (4.4) 吸取18 μ L上清,加入纯化的mcherry蛋白,混匀,室温静置反应20min后进行非变性蛋白凝胶电泳。

[0055] (4.5) 结果如图5所示,D10、C1、B3、E3的表达上清与mcherry蛋白反应,使表达上清与mcherry蛋白的混合物在进行非变性蛋白凝胶电泳时与mcherry电泳速度有较大差异,产生位移,说明这些nanobody可与mcherry结合。

[0056] 最后,通过测序确定D10与C1的序列,获得两株mcherry纳米抗体。

[0057] 本实施例提供2个抗mcherry纳米抗体。

[0058] 实施例2

mEOS纳米抗体的制备方法,包括以下步骤:

(1) 构建mEOS纳米抗体文库:

(1.1) 免疫使用的蛋白为大肠杆菌表达的mEOS蛋白,首次免疫时,取0.5mg mEOS蛋白与等体积的弗氏完全佐剂震荡混匀乳化后,于羊驼颈部分点注射,总计免疫四次,每两周免疫一次,每次免疫蛋白用量为0.5mg,加强免疫所使用的佐剂均为弗氏不完全佐剂。四免后四天左右,采集至少20mL羊驼全血,使用淋巴细胞分离液分离出PBMC。

[0059] (1.2) 提取PBMC的总RNA(利用trizol法)。

[0060] (1.3) 将RNA反转录为cDNA,操作步骤参照PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA

Synthesis Kit(购自takara)说明书进行。

[0061] (1.4)以cDNA为模板进行巢式PCR扩增VHH片段,第一轮PCR的引物为:

上游引物为: GGTGGTCCTGGCTGC;

下游引物为: GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC。

[0062] 退火温度为56℃,循环数为23,可扩增出两个片段,大小分别约为1000bp的VH片段和700bp的VHH片,切胶回收700bp大小的VHH基因片段。

[0063] 以第一轮PCR产物为模板进行第二轮PCR,引物为:

上游引物:

CTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG;

下游引物:

GTGTTGGCCTCCCGGGCCGCGTGCGCCTGAGGAGACGGTGACCTGGGTCC。

[0064] 退火温度为58℃,循环数为12,此次目的片段的大小约为500bp,用PCR产物纯化试剂盒纯化此片段。

[0065] (1.5)用Bg11内切酶酶切回收的目的基因片段及pADL-10b载体,并用T4连接酶连接载体及VHH片段,并将连接产物转化大肠杆菌SS320感受态细胞,即为构建好的mEOS纳米抗体细菌文库,计算得文库库容为 1×10^8 ,挑取24个单克隆用PCR检测VHH序列插入率,引物为:

CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTA/GCGTAACGATCTAAAGTTTTGTCG,结果显示其插入率为:79%。

[0066] (2)筛选mEOS纳米抗体文库:

(2.1)于5mL免疫管中加入200 μ g溶解于PBS的 mEOS蛋白,4℃包被过夜,同时设置包被BSA的阴性对照。

[0067] (2.2)加入2 mL 3%的BSA室温封闭2h,加入500 μ L噬菌体溶液(噬菌体展示文库效价为 1.48×10^{13} cfu),室温下作用1h。

[0068] (2.3)用PBST(tween浓度为0.05%)清洗免疫管10次以去除未结合的噬菌体,加入0.25mg/mL trypsin 洗脱30min将与蛋白特异性结合的噬菌体洗脱下来,将噬菌体感染处于对数生长期的的大肠杆菌SS320,用于准备下一轮筛选所需要的噬菌体及检测此次筛选的效果。

[0069] (2.4)以上筛选过程需重复2轮,随着筛选轮数的增加,包被蛋白量应适当减少,清洗条件也应设置更严苛。

[0070] (2.5)筛选结果表2所示,经过两轮筛选后,能结合抗原的抗体文库得到了富集,可进行后续实验找到结合抗原的单克隆。

| | input 效价 | mEOS效价 | BSA对照效价 |
|-------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| 第一轮筛选 | 1.48×10^{13} | 1.36×10^6 | 1.84×10^4 |
| 第二轮筛选 | 1×10^{13} | 4.5×10^8 | 1.36×10^5 |

[0071] 表2

(3)ELISA筛选特异的阳性单克隆

(3.1)经过2轮筛选后,挑取94个感染噬菌体的SS320单克隆,并挑取两个未感染噬菌体的SS320作为对照。接种于200 μ L的2 \times YT培养基(Amp、Tet抗性),达到对数生长期后加

入辅助噬菌体M13k07、kana及IPTG,于30℃过夜培养,离心去菌体沉淀,噬菌体上清备用。

[0072] (3.2)取酶标板包被mEOS蛋白,3%BSA封闭后加入50μL噬菌体上清室温下作用1h。

[0073] (3.3)TBST清洗后加入Anti-fd bacteriophage antibody(购自sigma),室温下作用1h。

[0074] (3.4)TBST清洗后加入Goat anti-rabbit IgG HRP conjugated,室温下作用1h。

[0075] (3.5)TBST清洗,加入TMB显色液显色,终止后用酶标仪于450nm读数。

[0076] (3.6)结果表3所示,斜体数值表示显色值较高,与抗原结合能力强,挑取显色值较高的单克隆,PCR扩增后用Hinf1酶切,挑取序列不重复的克隆进行后续实验,这些克隆为:A2、B9、D1、E1、E8、F1、G2、H1。

| <> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| A | 2.461 | <i>3.093</i> | 0.116 | 0.151 | 0.169 | 2.497 | 2.812 | 0.135 | 0.431 | 2.812 | 2.761 | 0.106 |
| B | 0.329 | <i>3.198</i> | <i>3.198</i> | <i>3.004</i> | 0.184 | 2.365 | 0.148 | 0.142 | <i>3.336</i> | 0.298 | 0.142 | 0.148 |
| C | 2.862 | 0.489 | 0.139 | 0.515 | <i>3.914</i> | 0.307 | 0.543 | 0.263 | <i>3.388</i> | 0.323 | <i>3.914</i> | <i>3.25</i> |
| D | <i>3.234</i> | 0.186 | <i>3.234</i> | <i>3.898</i> | <i>3.898</i> | 1.974 | <i>3.234</i> | <i>3.898</i> | <i>3.898</i> | <i>3.566</i> | 0.143 | 0.923 |
| E | <i>3.249</i> | <i>3.581</i> | 0.53 | <i>3.912</i> | 0.358 | <i>3.249</i> | <i>3.581</i> | <i>3.249</i> | 2.917 | <i>3.142</i> | 0.103 | <i>3.249</i> |
| F | <i>3.049</i> | <i>3.575</i> | 0.188 | 0.262 | <i>3.907</i> | 0.291 | <i>3.575</i> | <i>3.136</i> | 0.268 | <i>3.136</i> | <i>3.907</i> | 0.126 |
| G | <i>3.161</i> | <i>3.161</i> | 0.177 | 0.198 | <i>3.931</i> | <i>3.931</i> | <i>3.405</i> | <i>3.931</i> | <i>3.931</i> | <i>3.931</i> | <i>3.6</i> | 0 |
| H | <i>3.08</i> | 0.215 | 2.277 | 2.919 | <i>3.187</i> | <i>3.85</i> | 2.992 | 0.282 | 2.448 | 1.347 | 2.748 | 0 |

[0077] 表3

(4)Native binding 检测nanobody与抗原蛋白结合

(4.1)挑取A2、B9、D1、E1、E8、F1、G2、H1单克隆于2×YT培养基(Amp、Tet抗性),于37℃培养。

[0078] (4.2)OD600达到0.6时,加入IPTG诱导6h。

[0079] (4.3)离心收取菌体沉淀,加入CelLytic™ B裂解液(购自sigma),室温裂解15min,离心收集上清。

[0080] (4.4)吸取18μL上清,加入16μg纯化的mEOS蛋白,混匀,室温静置反应20min后进行非变性蛋白凝胶电泳。

[0081] (4.5)结果如图6、图7所示,各个单克隆的表达上清与mEOS蛋白反应,使表达上清与mEOS蛋白的混合物在进行非变性蛋白凝胶电泳时与mEOS电泳速度有较大差异,产生位移,说明这些nanobody均可与mEOS结合。

[0082] 最后,测序结果显示E1与F1的氨基酸序列一致,所以共计有七个不同的纳米抗体序列,分别为:A2、B9、D1、E1、E8、G2、H1。本实施例提供七个抗mEOS纳米抗体。

[0083] 本领域的技术人员应该知道,本发明中的编码基因(DNA分子)还可以以“表达盒”或“重组载体”的形式存在。“表达盒”是指线性或环状的核酸分子,涵盖了能够指导特定核苷酸序列在恰当宿主细胞中表达的DNA和RNA序列。一般而言,包括与目标核苷酸有效连接的启动子,其任选的是与终止信号和/或其他调控元件有效连接的。表达盒还可以包括核苷酸序列正确翻译所需的序列。编码区通常编码目标蛋白,但在正义或反义方向也编码目标功能RNA,例如反义RNA或非翻译的RNA。包含目标多核苷酸序列的表达盒可以是嵌合的,意指至少一个其组分与其至少一个其他组分是异源的。表达盒还可以是天然存在的,但以用于异源表达的有效重组形成获得的。

[0084] 上述实施例为本发明较佳的实现方案,除此之外,本发明还可以其它方式实现,在不脱离本技术方案构思的前提下任何显而易见的替换均在本发明的保护范围之内。

[0085] 为了让本领域普通技术人员更方便地理解本发明相对于现有技术的改进之处,本发明的一些附图和描述已经被简化,并且为了清楚起见,本申请文件还省略了一些其它元素,本领域普通技术人员应该意识到这些省略的元素也可构成本发明的内容。

序列表

<110> 南华大学

<120> mcherry或mEOS纳米抗体及其制备方法和应用

<160> 18

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 384

<212> DNA

<213> Lama pacos

<400> 1

```

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtgcagcctg gggagtctct gagactctcc 60
tgtgatgcct cagaattccg gttcaattat tatgcatag gttggttccg ccaggcccca 120
ggaaaggggc gtgagggggt ctcatgtatt tctatgaatg acggtagtac aaagtatgga 180
gactccgtga aggaccgatt caccatctcc aaagacaaca ccaagaacac agtgtatctg 240
caaatgaaca gcccgaagcc tgaggacacg gccgtttatt cctgtgcagc aaaacgaggc 300
ccgatttgta ccttcgtaga atcggcctat gactcctggg gccaggggac ccaggtcacc 360
gtctcctcag gcgcacgcgg cccg 384

```

<210> 2

<211> 128

<212> PRT

<213> Lama pacos

<400> 2

```

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu Ser
1           5           10           15
Leu Arg Leu Ser Cys Asp Ala Ser Glu Phe Arg Phe Asn Tyr Tyr Ala
           20           25           30
Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val Ser
           35           40           45
Cys Ile Ser Met Asn Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val Lys
           50           55           60
Asp Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65           70           75           80
Gln Met Asn Ser Pro Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys Ala
           85           90           95
Ala Lys Arg Gly Pro Ile Cys Thr Phe Val Glu Ser Ala Tyr Asp Ser
           100          105          110
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Arg Gly Pro
           115          120          125

```

<210> 3

<211> 378

<212> DNA

<213> Lama pacos

<400> 3

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggattg gtgcaggctg ggggctctct gagactctcc 60
 tgtacagcct ctggaggcac cttcagtacc tatgccatgg gctggttccg ccaggctcca 120
 gggaaggagc gtgagtttgt agcagctatt acctggagtg gtggtgacac atactatgca 180
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240
 caaatggaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtttatt actgtgcagc agacccttac 300
 ggtagtagct ggcaccatt atgggcccga actcagtatg actactgggg ccaggggacc 360
 caggtcaccg tctcctca 378

<210> 4

<211> 126

<212> PRT

<213> Lama pacos

<400> 4

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Gly | Leu | Val | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gly | Ala | Gly | Gly | Ser |
| 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Leu | Ala | Leu | Ser | Cys | Thr | Ala | Ser | Gly | Gly | Thr | Pro | Ser | Thr | Thr | Ala |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Met | Gly | Thr | Pro | Ala | Gly | Ala | Pro | Gly | Leu | Gly | Ala | Gly | Pro | Val | Ala |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Ala | Ile | Thr | Thr | Ser | Gly | Gly | Ala | Thr | Thr | Thr | Ala | Ala | Ser | Val | Leu |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Gly | Ala | Pro | Thr | Ile | Ser | Ala | Ala | Ala | Ala | Leu | Ala | Thr | Val | Thr | Leu |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | |
| Gly | Met | Ala | Ser | Leu | Leu | Pro | Gly | Ala | Thr | Ala | Val | Thr | Thr | Cys | Ala |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Ala | Ala | Pro | Thr | Gly | Ser | Ser | Thr | His | Pro | Leu | Thr | Ala | Ala | Thr | Gly |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | 110 | |
| Thr | Ala | Thr | Thr | Gly | Gly | Gly | Thr | Gly | Val | Thr | Val | Ser | Ser | | |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | |

<210> 5

<211> 366

<212> DNA

<213> Lama pacos

<400> 5

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtgcagcctg gggggtctct gagactctcc 60

tgtgcagcct ctggattcac tttggattat tatgcatag gctggttccg ccaggcccca 120
 gggaaggagc gtgaggggt ctcattgtatt agtcgtagcg atattaccac gcaactatgca 180
 gactccgtga aaggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac agtgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacaca gccgtttatt actgtgcagc acgtatgaat 300
 tacttctgta caatctctat gtcctatgac tactggggcc aggggacca ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

<213> Lama pacos

<400> 6

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Gly | Leu | Val | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gly | Pro | Gly | Gly | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Leu | Ala | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Pro | Thr | Leu | Ala | Thr | Thr | Ala |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Ile | Gly | Thr | Pro | Ala | Gly | Ala | Pro | Gly | Leu | Gly | Ala | Gly | Gly | Val | Ser |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | 45 | | | | |
| Cys | Ile | Ser | Ala | Ser | Ala | Ile | Thr | Thr | His | Thr | Ala | Ala | Ser | Val | Leu |
| | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | | | |
| Gly | Ala | Pro | Thr | Ile | Ser | Ala | Ala | Ala | Ala | Leu | Ala | Thr | Val | Thr | Leu |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | |
| Gly | Met | Ala | Ser | Leu | Leu | Pro | Gly | Ala | Thr | Ala | Val | Thr | Thr | Cys | Ala |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Ala | Ala | Met | Ala | Thr | Pro | Cys | Thr | Ile | Ser | Met | Ser | Thr | Ala | Thr | Thr |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | 110 | |
| Gly | Gly | Gly | Thr | Gly | Val | Thr | Val | Ser | Ser | | | | | | |
| | | 115 | | | | | | 120 | | | | | | | |

<210> 7

<211> 366

<212> DNA

<213> Lama pacos

<400> 7

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtgcagcctg gggggtctct gagactctcc 60
 tgtgcaacct ctggattcac ttcggattct tatgtgatag cgtggttccg ccaggcccca 120
 gggaaggagc gtgaggggt cttatgtatt aatggtagag gtagtagcgc gatctatgca 180
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaatac ggtgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacaca gccgtttatt actgtgcatt ccggtacgtc 300
 ggctgttcag gctttcaagg ctctatcag tactggggcc aggggacca ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 8
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Lama pacos
 <400> 8
 Val Gly Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Gly Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Pro Thr Ser Ala Ser Thr Val
 20 25 30
 Ile Ala Thr Pro Ala Gly Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gly Gly Val Leu
 35 40 45
 Cys Ile Ala Gly Ala Gly Ser Ser Ala Ile Thr Ala Ala Ser Val Leu
 50 55 60
 Gly Ala Pro Thr Ile Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ala Thr Val Thr Leu
 65 70 75 80
 Gly Met Ala Ser Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Val Thr Thr Cys Ala
 85 90 95
 Pro Ala Thr Val Gly Cys Ser Gly Pro Gly Gly Ser Thr Gly Thr Thr
 100 105 110
 Gly Gly Gly Thr Gly Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Lama pacos
 <400> 9
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggattg gtgcaggctg gggactctct gagactctcc 60
 tgtgcagcct ctggaagcac ctttagttgg tatgccatgg gctggttccg ccaggctcca 120
 ggaaaggagc gtgagtttgt agcagctacg agccggagta gccctaccac atactatgca 180
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtttctg 240
 caaatgacta gcctgaaacc tgaggacacg gccgtttatt tctgtgcggg gcgtgtagga 300
 cctgggggtgc cacgtattcc ccaatcatat agctactggg gccaggggac ccaggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 10
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Lama pacos
 <400> 10
 Val Gly Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Gly Ala Gly Ala Ser

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Leu Ala Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Pro Ser Thr Thr Ala | | | |
| | 20 | 25 | 30 |
| Met Gly Thr Pro Ala Gly Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gly Pro Val Ala | | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| Ala Thr Ser Ala Ser Ser Pro Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ser Val Leu | | | |
| | 50 | 55 | 60 |
| Gly Ala Pro Thr Ile Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ala Thr Val Pro Leu | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Gly Met Thr Ser Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Val Thr Pro Cys Ala | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Gly Ala Val Gly Pro Gly Val Pro Ala Ile Pro Gly Ser Thr Ser Thr | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Thr Gly Gly Gly Thr Gly Val Thr Val Ser Ser | | | |
| | 115 | 120 | |

<210> 11

<211> 342

<212> DNA

<213> Lama pacos

<400> 11

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtgcaggctg ggggatctct aacactctcc 60
 tgtgcagcct ctggaagctt cttcagtatc aatggcatcg gctggtaccg ccaggctcca 120
 gggaagcagc gcgagtggc cgcaagtatt agtagtgatg gtagcataga ctatacagac 180
 tccgtgaagg gccgattcac catctcagga gacaacgcca agcacacggt gtatctgcaa 240
 atgaacagcc tgaaacctga ggatacggcc gtctattact gtggtgcacg taggcgttgg 300
 gttaattact ggggccaggg gaccaggtc accgtctct ca 342

<210> 12

<211> 114

<212> PRT

<213> Lama pacos

<400> 12

| | | | |
|---|----|----|----|
| Val Gly Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Gly Ala Gly Gly Ser | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Pro Pro Ser Ile Ala Gly | | | |
| | 20 | 25 | 30 |
| Ile Gly Thr Thr Ala Gly Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gly Leu Val Ala | | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| Ser Ile Ser Ser Ala Gly Ser Ile Ala Thr Thr Ala Ser Val Leu Gly | | | |
| | 50 | 55 | 60 |

<211> 342

<212> DNA

<213> Lama pacos

<400> 15

```
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtgcagcctg gggggtctct gagactctcc 60
tgtgcagcct ctggaagcat ctgcgtatc gcacccatgg gctggtaccg ccaggctcca 120
gggaagcagc gcgagttggt cgcagctatt tcaagtgggt gtaacacaaa ctatgcagac 180
tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaacgcca agatcacggt atatctgcaa 240
atgaacagcc tggagtctga ggacacggcc gtgtattact gtaaagcagt gttcttgggc 300
cgatcttact ggggccaggg gaccacggtc accgtctct ca 342
```

<210> 16

<211> 114

<212> PRT

<213> Lama pacos

<400> 16

```
Val Gly Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Gly Pro Gly Gly Ser
1           5           10          15
Leu Ala Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ser Ala Ile Ala Pro
          20          25          30
Met Gly Thr Thr Ala Gly Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gly Leu Val Ala
          35          40          45
Ala Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Ala Thr Ala Ala Ser Val Leu Gly
          50          55          60
Ala Pro Thr Ile Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ile Thr Val Thr Leu Gly
65          70          75          80
Met Ala Ser Leu Gly Ser Gly Ala Thr Ala Val Thr Thr Cys Leu Ala
          85          90          95
Val Pro Leu Gly Ala Ser Thr Thr Gly Gly Gly Thr Gly Val Thr Val
          100         105         110
Ser Ser
```

<210> 17

<211> 351

<212> DNA

<213> Lama pacos

<400> 17

```
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtgcagcctg gggggtctct gagactctcc 60
tgtgcagcct ctggattctt cttcagtagc tatccatga gctggtaccg ccaggctcca 120
gggctggagc gcgagttggt cgcagccatt attggtgggt gtggtggcac aaactatgca 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240
```

caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtatatt actgtaacgc ccgccgtac 300
 gcgccaacga gagactactg gggccagggg acccaggtca ccgtctctc a 351
 <210> 18
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Lama pacos
 <400> 18
 Val Gly Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Gly Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Pro Pro Ser Ser Thr His
 20 25 30
 Met Ser Thr Thr Ala Gly Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gly Leu Val Ala
 35 40 45
 Ala Ile Ile Gly Gly Gly Gly Gly Thr Ala Thr Ala Ala Ser Val Leu
 50 55 60
 Gly Ala Pro Thr Ile Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ala Thr Val Thr Leu
 65 70 75 80
 Gly Met Ala Ser Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Val Thr Thr Cys Ala
 85 90 95
 Ala Ala Ala Thr Ala Pro Thr Ala Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Gly
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

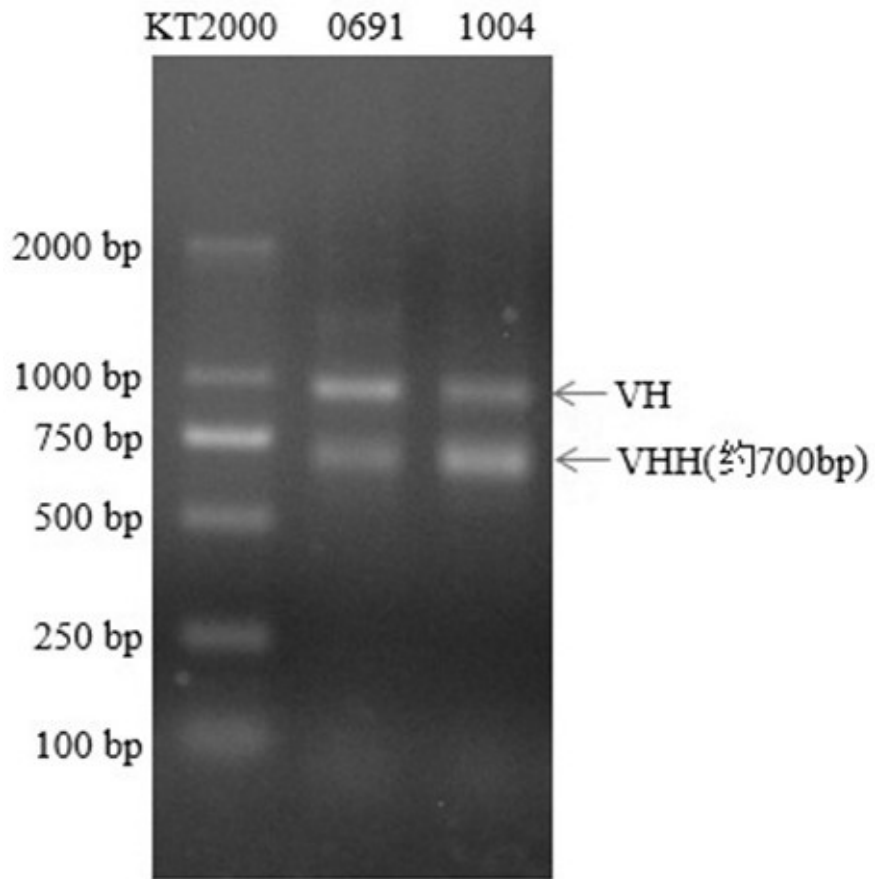


图1

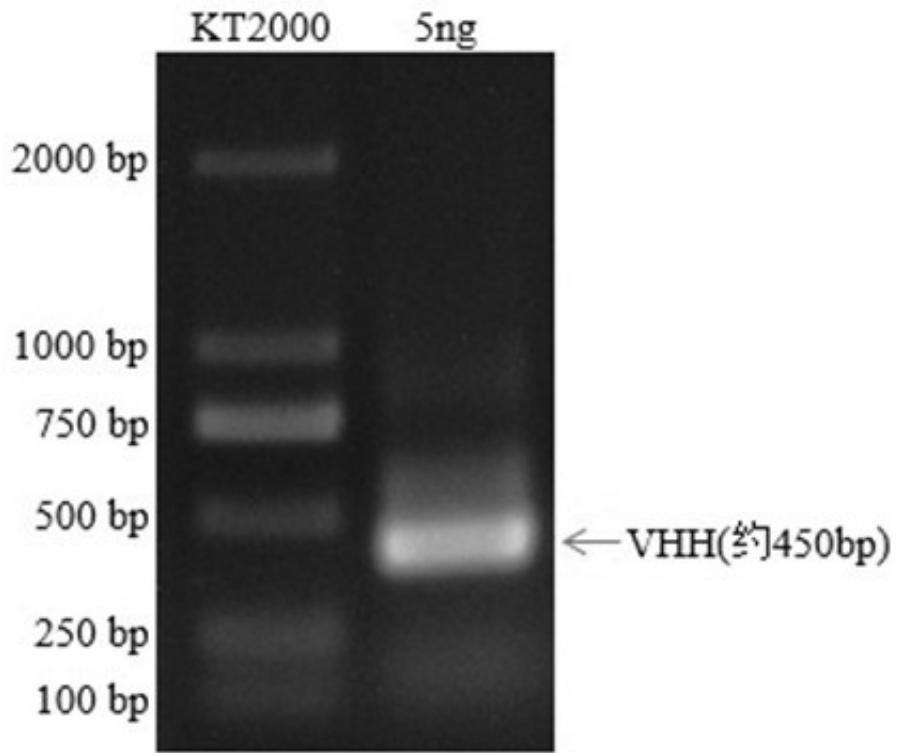


图2

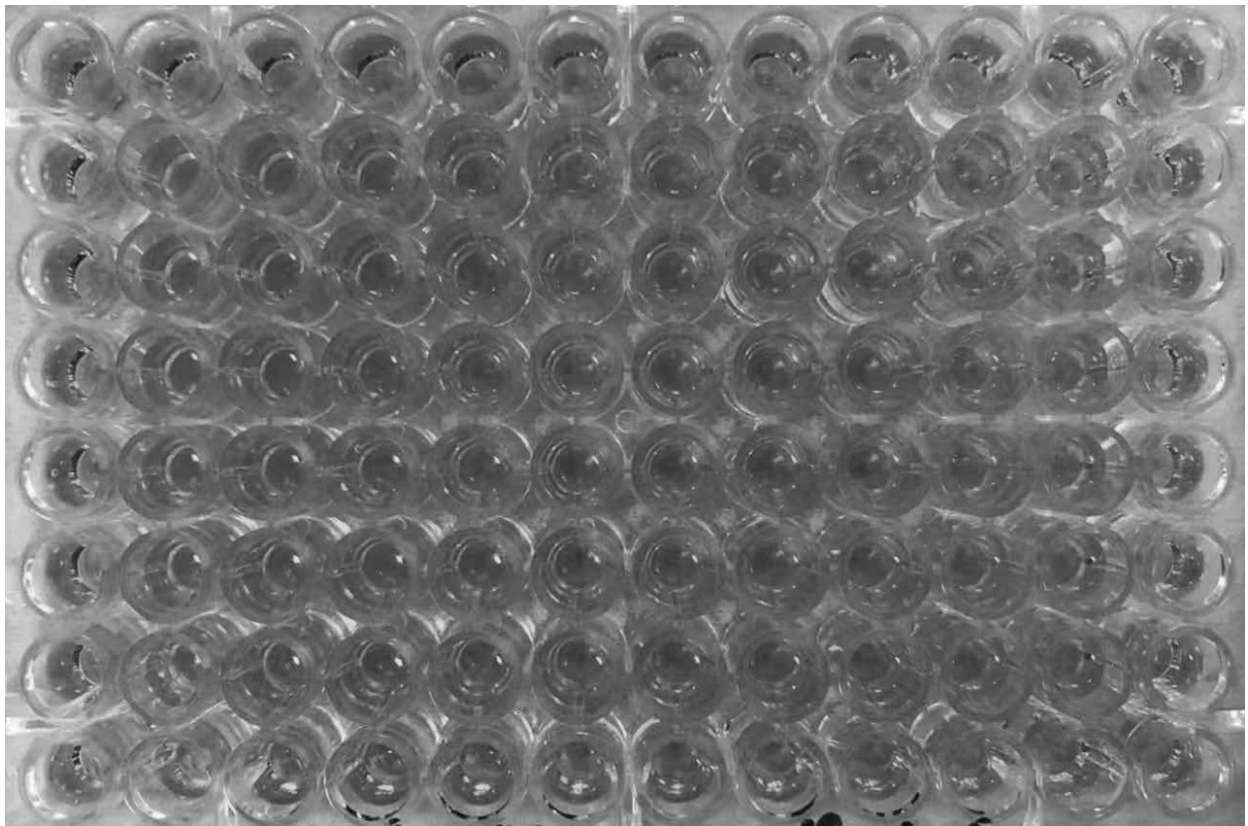


图3

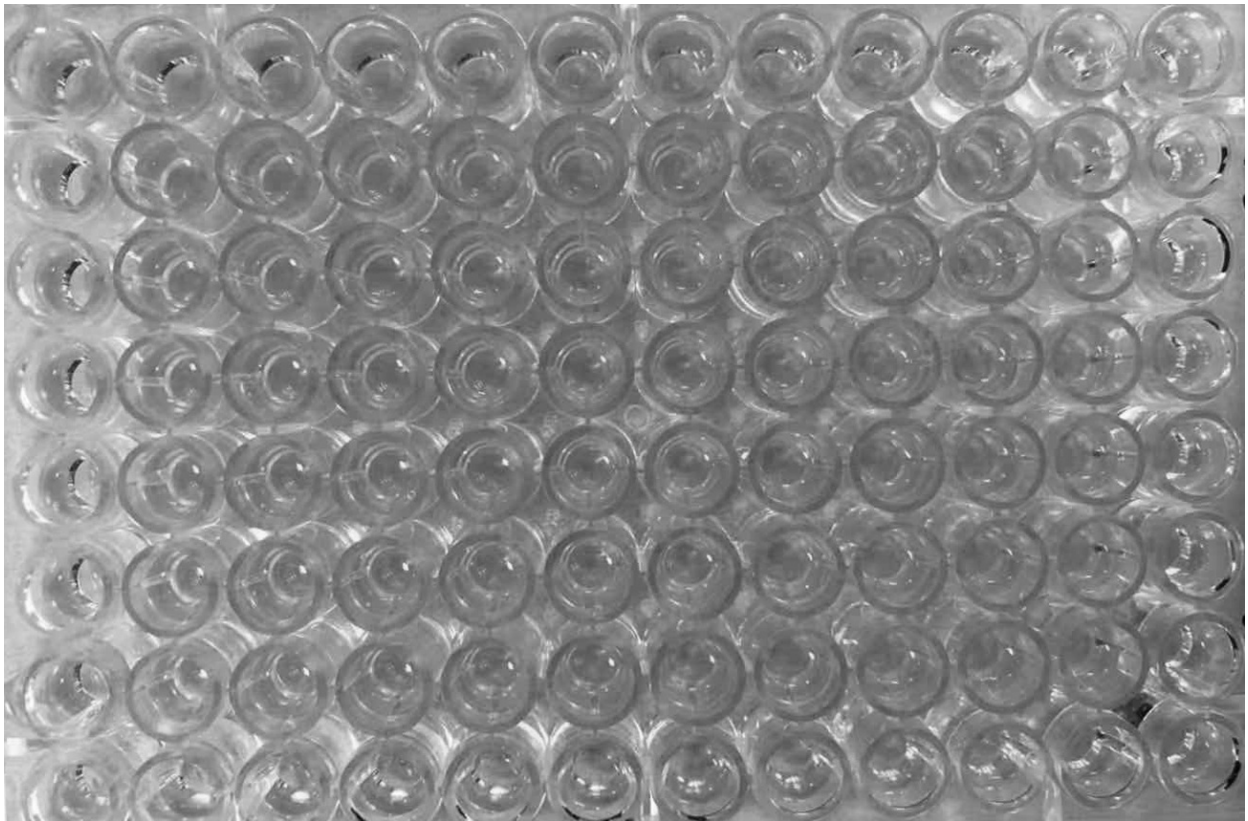


图4

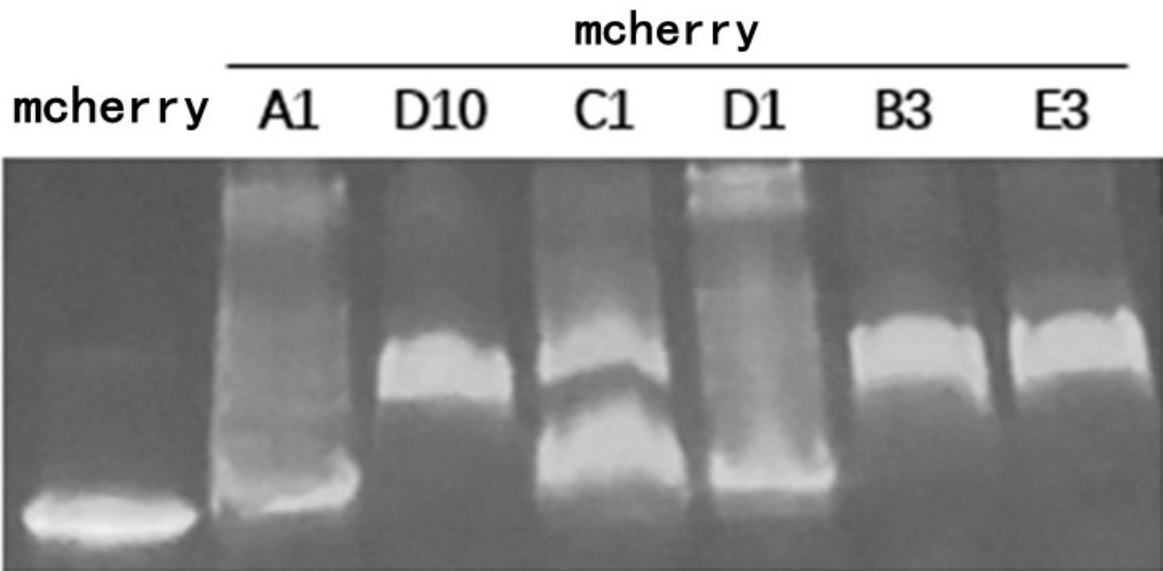


图5

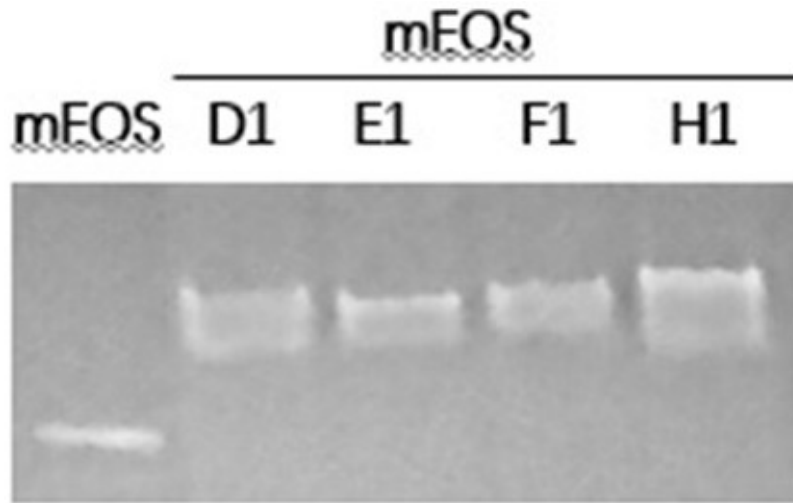


图6

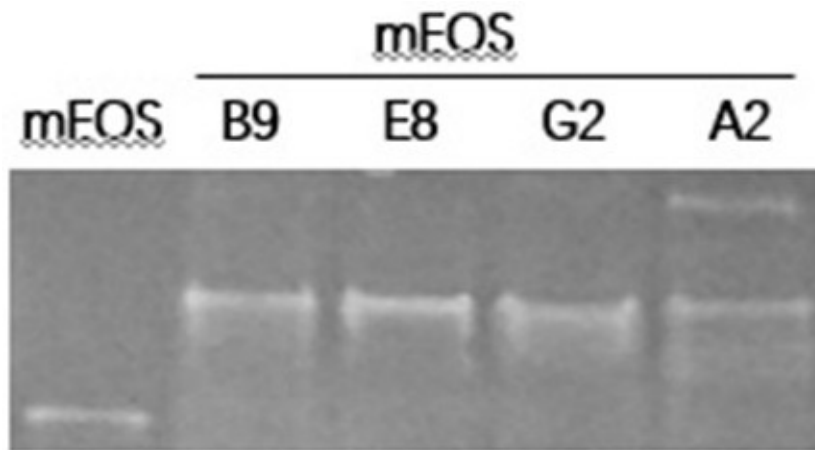


图7