



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112661849 B

(45) 授权公告日 2022.05.20

(21) 申请号 202011495703.8

(22) 申请日 2020.12.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112661849 A

(43) 申请公布日 2021.04.16

(73) 专利权人 杭州贤至生物科技有限公司
地址 310000 浙江省杭州市余杭区东湖街
道东湖北路488-1号16幢401室

(72) 发明人 武妮妮 武戎青 刘清泉 余卫
余铭恩

(74) 专利代理机构 杭州橙知果专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33261
专利代理师 杜放

(51) Int. Cl.
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 110806478 A, 2020.02.18
WO 98/45706 A1, 1998.10.15
CN 109336979 A, 2019.02.15
WO 2013/028810 A1, 2013.02.28

NCBI.GenBank登录号:ADU24720.1.《NCBI
GenBank》.2016,第1-116位.

NCBI.GenBank登录号:AAA39080.1.《NCBI
GenBank》.1993,第1-133位.

NCBI.GenBank登录号:B41940.《NCBI
GenBank》.2000,第1-113位.

NCBI.GenBank登录号:AAA16583.1.《NCBI
GenBank》.1994,第1-117位.

王建霞等.艰难梭菌谷氨酸脱氢酶的表达及
抗原性分析.《军事医学》.2016,第40卷(第9期),
第710-732页.

方媛等.双峰驼源天然噬菌体纳米抗体展示
库的构建及抗GDH纳米抗体筛选.《中国生物工程
杂志》.2018,第38卷(第12期),第49-56页.

Kasper Krogh Andersen等
.Neutralization of Clostridium difficile
Toxin B Mediated by Engineered
Lactobacilli That Produce Single-Domain
Antibodies.《Infection and Immunity》.2016,
第84卷(第2期),第395-406页.

Zanzan Zhu等.Single domain antibody
coated gold nanoparticles as enhancer for
Clostridium difficile toxin detection by
electrochemical impedance immunosensors.
《Bioelectrochemistry》.2014,第101卷第153-
158页.

审查员 胡百灵

权利要求书1页 说明书6页
序列表4页

(54) 发明名称
一种艰难梭菌重组蛋白单克隆抗体的制备
方法和应用

(57) 摘要
本发明属于生物技术领域。本发明涉及一种
重组蛋白,该重组蛋白由艰难梭菌膜蛋白-谷氨
酸脱氢酶(GDH)的两段优势抗原表位重复串联组
成,为提高该重组蛋白在大肠杆菌中的表达量,
采用大肠杆菌偏爱密码子将该重组蛋白氨基酸

序列转换为对应的核苷酸序列,化学合成该核苷
酸序列并构建重组表达载体。本发明还涉及该重
组蛋白免疫小鼠建立噬菌体库,经淘选筛选得到
对应GDH单链抗体scfv序列,将得到的scfv序列
构建成完整鼠IgG1抗体序列表达载体,通过瞬转
HEK293F细胞表达单克隆抗体,纯化单克隆抗体
并分别标记辣根过氧化物酶(HRP),ELISA正交实
验确定最佳单抗配对组合。

1. 一组用于艰难梭菌GDH检测试剂盒的抗体,其特征在于:包括包被抗体和标记抗体,所述包被抗体为3B12,标记抗体为5E3;

所述包被抗体3B12的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;

所述包被抗体3B12的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示;

所述标记抗体5E3的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示;

所述标记抗体5E3的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。

2. 根据权利要求1所述的用于艰难梭菌GDH检测试剂盒的抗体,其特征在于:所述包被抗体3B12的编码轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示,编码重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示。

3. 根据权利要求1所述的用于艰难梭菌GDH检测试剂盒的抗体,其特征在于:所述标记抗体5E3的编码轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示,编码重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示。

4. 一组质粒载体,其特征在于:包括含有如SEQ ID NO.5所示的轻链可变区核苷酸序列的质粒载体、含有如SEQ ID NO.6所示的重链可变区核苷酸序列的质粒载体、含有如SEQ ID NO.7所示的轻链可变区核苷酸序列的质粒载体及含有如SEQ ID NO.8所示的重链可变区核苷酸序列的质粒载体。

5. 一种根据权利要求1所述的用于艰难梭菌GDH检测试剂盒的抗体制备方法,其特征在于:

将含有如SEQ ID NO.5所示的轻链可变区核苷酸序列的质粒载体和含有如SEQ ID NO.6所示的重链可变区核苷酸序列的质粒载体共转染至HEK293F细胞,表达得到包被抗体3B12;

将含有如SEQ ID NO.7所示的轻链可变区核苷酸序列的质粒载体和含有如SEQ ID NO.8所示的重链可变区核苷酸序列的质粒载体共转染至HEK293F细胞,表达得到标记抗体5E3。

一种艰难梭菌重组蛋白单克隆抗体的制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域。具体的说,本发明表达了一种新的重组蛋白,本发明涉及使用上述重组蛋白免疫小鼠建立噬菌体库,筛选得到特异性单链抗体scfv序列,还涉及将得到的scfv序列构建成真核表达载体表达GDH单克隆抗体,并应用于艰难梭菌感染(CDI)的早期诊断。

背景技术

[0002] 艰难梭菌(*Clostridium difficile*)对氧极为敏感,分离培养较困难.故命名为艰难梭菌。艰难梭菌是一种厌氧生长的革兰阳性梭状产毒芽孢杆菌,而人的肠道是一个相对无氧的环境,所以它是人类肠道中的正常菌群,不规范使用抗生素时,可导致肠道菌群失调。

[0003] 艰难梭菌感染(CDI)是一种细菌毒素介导的疾病并且是医院获得性感染的主要原因。大多数CDI是肠道内微生物群系失调(正常肠道菌群的破坏)引起的,是先前用广谱抗生素治疗的结果,因为广谱抗生素促进了艰难梭菌的繁殖。自相矛盾的是,用于治疗CDI的这些抗生素恰恰又延长了允许这种病原体引起疾病的失调,结果导致了更高比例的疾病复发。感染艰难梭菌会导致感染范围从中度腹泻和假膜性结肠炎到中毒性巨结肠、败血症和死亡的症状。

[0004] CDI最常见于伴有合并症的老年患者,感染通常在用广谱抗生素治疗以后发生。抗生素介导的有益肠道微生物群落的破坏让艰难梭菌的定居和感染成为可能。通常用于治疗CDI的抗生素(甲硝唑、万古霉素、和非达霉素)延长了肠道生态失调,并且导致停止抗生素治疗后感染复发率达到了13%-25%。美国每年发生超过50万例艰难梭菌的新病例,并且估计每年在欧洲发生超过40万例诊断的CDI事件。

[0005] 谷氨酸脱氢酶(GDH)是艰难梭菌的一种膜蛋白,稳定性好,是检测CDI的高敏感性、低特异性的酶。GDH位于细胞表面,所以免疫动物后能产生高滴度抗体,在对多个物种的GDH的氨基酸序列进行分析时发现,GDH具有高度保守性和低点突变率等优点。总之,GDH作为艰难梭菌的一种种属特异性蛋白,非常适合用于CDI的检测。

[0006] 目前,艰难梭菌感染和疾病的有效治疗和预防措施是缺少的,所以艰难梭菌的检测对其感染的早期诊断有重要意义。艰难梭菌的检测方法有多种,主要以免疫学检测为主,因为其操作简单,灵敏快速,但是其中的过程还是有一些不足。比如在传统制备单克隆抗体方面,免疫原一般用的是天然抗原,而天然抗原的有些序列表位具有保守性,与其他物种有高度同源性,从而导致所制得的单克隆抗体特异性差,也可导致检测结果失真。用Balb/c小鼠腹水制备单克隆抗体的周期长,批间差异大。真核系统表达产物加工机制最接近体内天然形式,易保留生物活性,可以对表达产物进行适当修饰和区域分布;还可以用瞬时转染的方式快速灵活的制备单克隆抗体,使得制备周期大大缩短,且其稳定性强,批间差异小。故本发明所需单克隆抗体用真核系统表达。

发明内容

[0007] 设计目的:为解决传统制备单克隆抗体的不足之处,通过设计、合成重组GDH抗原并通过建立噬菌体库和真核细胞表达来制备其单克隆抗体,比传统单克隆抗体制备大大缩短了时间,并且得到的单克隆抗体稳定性高,均一性好,大大减小了批间差异。

[0008] 设计方案:为了实现上述设计目的。本申请:(1)以艰难梭菌GDH为靶抗原,分析并选择该抗原两个特异性优势抗原表位,序列比较结果显示所选择的两个抗原表位与其它蛋白序列无明显同源性。(2)为了促进所选择优势抗原表位对BALB/c小鼠免疫系统的刺激,增强免疫效果,故将所选择的两个优势抗原表位串联。(3)采用大肠杆菌偏爱密码子,将重组蛋白氨基酸序列转换为对应的核苷酸序列,以利于重组蛋白在大肠杆菌中的表达,提高表达量。(4)化学合成上一步骤得到的核苷酸序列,并通过酶切连接,将合成得到的核苷酸片段插入表达载体PET-28a(+),构建重组GDH蛋白表达载体。(5)重组GDH蛋白表达载体转化大肠杆菌ER2566感受态细胞,筛选得到重组蛋白表达菌株。(6)重组蛋白表达菌株大规模培养后,经超声破菌并低温离心,取溶液上清通过镍琼脂糖亲和层析柱亲和层析,洗脱得到纯化重组蛋白。(7)重组GDH蛋白多次免疫Balb/c小鼠后,取其脾脏分离淋巴细胞用来建立单链抗体scfv噬菌体展示库,使用重组GDH蛋白进行多轮淘选筛选最终得到能与重组GDH蛋白结合的单链抗体scfv序列。(8)将scfv序列构建成完整鼠IgG1表达载体并使用HEK293细胞表达单克隆抗体,使用Protein A亲和层析法纯化单克隆抗体,并分别标记辣根过氧化物酶(HRP)。(9)ELISA 正交实验筛选显示3B12单抗包被与5E3-HRP配对检测GDH为最佳组合。

具体实施方案:

[0009] 以下实施例虽然对本发明的设计思路作了比较详细的文字描述,但是这些文字描述,只是对本发明设计思路的简单文字描述,而不是对本发明设计思路的限制,任何不超出本发明设计思路的组合、增加或修改,均落入到本发明的保护范围内。

[0010] 实施例1:GDH优势抗原表位选择

[0011] 以艰难梭菌GDH为靶抗原,利用生物软件DNAssist2.0分析其抗原表位序列的亲水性及抗原性,选择A优势抗原表位和B优势抗原表位。同时,序列比较结果表明所选择的A、B两个优势抗原表位序列特异性高,具备广谱性,是 GDH的共有表位,与其它蛋白序列无明显同源性。

[0012] 实施例2:GDH优势抗原表位的串联

[0013] 为增强所选择抗原表位对小鼠免疫系统的刺激以利于后续实验的进行,将GDH的A、B两个优势抗原表位序列分别重复后再通过柔性片段(连续四个甘氨酸)连接,得到重组蛋白氨基酸序列。

[0014] 实施例3:优化编码重组GDH蛋白的核苷酸序列

[0015] 为了提高重组蛋白在大肠杆菌中的表达量,在重组蛋白氨基酸序列不变的前提下,根据大肠杆菌偏爱密码子将编码重组蛋白的氨基酸序列转化为对应的核苷酸序列,并在其上下游分别添加酶切位点BamHI和EcoRI对应的核苷酸序列后,由杭州贤至生物科技有限公司合成。合成后的目的基因克隆于 pMD19-T载体(宝生物工程大连有限公司)中。

[0016] 实施例4:构建重组GDH蛋白表达载体

[0017] 用限制性内切酶BamHI和EcoRI(宝生物工程大连有限公司)于37℃分别双酶切含

目的基因的pMD19-T载体和PET-28a(+)载体(德国Novagen公司)12小时,酶切产物分别行1%琼脂糖凝胶电泳,并分别切胶回收目的基因和PET-28a(+)载体(本发明所使用的胶回收试剂盒均来自宁波中鼎生物技术有限公司)。使用T4连接酶(宝生物工程大连有限公司)将回收的目的基因和PET-28a(+)载体按一定的比例于4℃连接12小时后,连接产物转化DH5 α 感受态细胞(杭州贤至生物科技有限公司),并涂布于含卡那青霉素抗性(50 μ g/mL)的LB平板,于37℃恒温培养12小时之后,于平板上挑取单克隆菌株至含卡那青霉素抗性(50 μ g/mL)的LB液体培养基,37℃恒温摇床培养12小时后,采用质粒纯化试剂盒(本发明所使用的质粒纯化试剂盒均来自于宁波中鼎生物技术有限公司)提取质粒,经BamHI和EcoRI双酶切鉴定后得到正确的重组表达载体。

[0018] 实施例5:构建重组GDH蛋白表达菌株

[0019] 将构建好的重组表达载体转化E.coli ER2566感受态细胞,并涂布于含卡那青霉素抗性(50 μ g/mL)的LB平板,于37℃过夜培养。第二日,挑取平板上单克隆菌株至含卡那青霉素抗性(50 μ g/mL)的LB液体培养基,37℃恒温摇床培养8小时后,加诱导剂异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(终浓度为1.0mmol/L)诱导表达4个小时后制备蛋白电泳样品。13.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明重组蛋白成功表达,得到重组GDH蛋白表达菌株。

[0020] 实施例6:纯化重组GDH蛋白

[0021] 接种重组GDH蛋白表达菌株至LB液体培养基,加卡那青霉素至终浓度为50 μ g/mL,37℃恒温摇床培养8小时后,用含50 μ g/mL卡那青霉素的LB液体培养基将该菌按1:100比例稀释后,分装至细菌培养瓶中,置37℃恒温摇床培养至OD600=0.8,加诱导剂异丙基硫代- β -D-半乳糖苷至终浓度为1.0mmol/L,继续培养诱导4小时。离心收集菌体后,低温超声破菌,低温离心后取上清通过镍琼脂糖亲和层析柱,经洗涤、洗脱最终得到纯化重组GDH蛋白。

[0022] 实施例7:单链抗体scfv噬菌体库构建

[0023] 取4-6周龄雌性Balb/c小鼠,基础免疫每只小鼠皮下多点注射弗氏完全佐剂乳化的100 μ g重组GDH蛋白,共400 μ l/只。20天后进行第二次加强免疫,方法为取80 μ g重组GDH蛋白用弗氏不完全佐剂乳化,共400 μ l/只,皮下多点注射。第三次加强免疫在15天以后,方法与第二次加强免疫相同。20天后,取120 μ g重组GDH蛋白腹腔加强注射,于72小时后,眼眶取血,并处死小鼠,取其脾脏用鼠脾脏淋巴细胞分离试剂盒(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司)分离鼠脾脏淋巴细胞。用RNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)从分离的淋巴细胞中提取总RNA,用反转录试剂盒(Takara)反转录合成cDNA,用鼠源单链抗体scfv通用简并引物扩增重链可变区以及轻链可变区基因,PCR产物分别进行1%琼脂糖凝胶电泳,并分别切胶回收目的基因,回收的目的基因通过overlap PCR链接成scfv,PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,并切胶回收目的基因经NotI和SfiI酶切后使用T4连接酶和pCANTAB5e(北京宝科维安生物技术有限公司)载体按一定比例于4℃连接12小时后,连接产物经胶回收试剂盒回收以去除里面的酶及缓冲物质,回收产物用细菌电转化仪(biorad)分多次电转入大肠杆菌TG1电转感受态,并涂布于含氨苄青霉素抗性(50 μ g/mL)及2%葡萄糖的2 \times YT-AG平板,于30℃恒温培养12小时之后,取适量的2 \times YT培养基用无菌玻璃棒将平板上的菌落全部刮取下来并收集菌体悬液,此为构建好的噬菌体抗体库。

[0024] 实施例8:单链抗体scfv的淘选及筛选

[0025] 从噬菌体抗体库中去取一定量的菌液接种到2 \times YT-AG培养液中使OD600为0.3。37

℃, 250rpm振荡1h左右, 使OD600达0.5后加入辅助噬菌体M13K07超感染, 感染比例为M13K07/TG1=20:1。37℃, 250rpm 振荡1h后3300g, 4℃离心10min沉淀细菌, 小心移弃上清。重悬细菌到含氨苄青霉素抗性(50μg/mL)及卡那青霉素抗性(50ug/mL)的2×YT-AK培养基中, 30℃, 250rpm振荡培养过夜。次日, 10800g, 4℃离心20min沉淀细菌。上清移入干净离心管中, 加入1/5体积的PEG/NaCl, 混合后冰浴2h。10800g, 4℃离心20min沉淀细胞, 小心移弃上清, 扣干, 将沉淀重悬于PBS 中, 用0.45μm膜过滤去除细菌碎片用于淘选步骤。将纯化的重组GDH抗原用包被液稀释至8μg/ml包被免疫管(Thermo), 每个免疫管4ml, 4℃过夜包被。次日, 弃去包被液和未吸附的抗原, 无菌PBST洗涤3次, 每个免疫管加入封闭液5ml, 37℃孵育2h。弃去封闭液, 无菌PBST洗涤3次后将经PEG沉淀获得的噬菌体加入到免疫管中, 每个免疫管加入4ml, 37℃孵育 1h。弃去免疫管中的液体, 用无菌PBST洗涤10次再用无菌PBS洗涤10次后加入1ml 100mM三乙胺将结合的噬菌体洗脱下来, 再立即加入500ul 1M Tris-HCl, pH 7.4进行中和。将中和后的噬菌体加入到一定量处于对数生长期的TG1大肠杆菌中进行超感染, 此为第一轮淘选富集过程。经过3轮淘选, GDH特异性scfv得以富集。将最后一轮洗脱中和后的噬菌体侵染TG1大肠杆菌后涂布于2×YT-AG平板上, 于30℃恒温培养12小时之后随机挑取 400-600个单克隆菌落于96孔深孔板中, 用2×YT-AG培养基37℃, 250rpm 振荡2h后加入一定量M13K07辅助噬菌体进行超感染, 37℃, 250rpm振荡 1h后离心去掉上清加入含氨苄青霉素抗性(50μg/mL)及卡那青霉素抗性(50μg/mL)的2×YT-AK培养基30℃, 250rpm过夜培养。第二天进行单克隆 ELISA筛选, 筛选步骤如下:

[0026] 包被: 用包被液稀释重组GDH蛋白至终浓度为1μg/mL, 100μL/孔加入酶标板(深圳金灿华实业有限公司), 4℃过夜后通过DEM-3型洗板机(中山大学达安基因股份有限公司)用洗涤液洗涤1次;

[0027] 封闭: 以200μL/孔加入封闭液, 37℃封闭2h, 通过洗板机用洗涤液洗涤1次;

[0028] 加样: 加过夜诱导表达的细菌培养上清及对照血清, 100μL/孔, 37℃孵育1h, 通过洗板机用洗涤液洗涤3次;

[0029] 加酶标抗体: 以100μL/孔加入新鲜稀释兔抗M13噬菌体HRP酶标二抗(购自北京义翘神州生物技术有限公司), 37℃孵育30分钟后, 通过洗板机用洗涤液洗涤4次;

[0030] 加显色液: 每孔加显色液A和显色液B各50μL, 37℃避光显色10分钟;

[0031] 终止反应: 以50μL/孔加入2M H₂SO₄;

[0032] 结果判定: 在酶标仪上, 于450nm处, 空白孔校零后读取OD值。以免疫小鼠血清作为阳性对照。结果显示有14个阳性克隆OD值较高, 经测序得到6株scfv序列, 分别为3B12、5A1、5E3、4F4、7H1、7G5。相关溶液配方如下:

[0033] 包被液: Na₂CO₃ 1.5g, NaHCO₃ 2.9g, 加ddH₂O定容至1000mL (pH9.6)。

[0034] 封闭液: Na₂HPO₄·12H₂O 2.68g, NaH₂PO₄·2H₂O 0.39g, NaCl 8.5g, 20g 牛血清白蛋白, 加ddH₂O定容至1000mL (pH7.4)。

[0035] 洗涤液: Na₂HPO₄·12H₂O 2.68g, NaH₂PO₄·2H₂O 0.39g, NaCl 8.5g, Tween-20 0.5mL, 加ddH₂O定容至1000mL (pH7.4)。

[0036] 显色液A: 200mg TMB溶于100mL无水乙醇, 加ddH₂O定容至1000mL。

[0037] 显色液B: 柠檬酸2.1g, Na₂HPO₄·12H₂O 71g, 加ddH₂O定容至1000mL。

[0038] 使用时: 1mL显色液A+1mL显色液B+0.4μL 30%H₂O₂

[0039] 终止液:2M H_2SO_4 , 21.7mL浓 H_2SO_4 加dd H_2O 定容至1000mL。

[0040] 实施例9:真核表达载体构建及HEK293F细胞瞬转表达和纯化

[0041] 将6株GDH单链抗体scfv序列分别构建成完整鼠IgG1抗体序列,即将scfv中重链可变区与轻链可变区通过PCR分别与鼠IgG1重链恒定区和轻链恒定区桥接,再分别插入到pcDNA3.1(德国Novagen公司)质粒中。分别通过PEI将构建好的重链质粒与轻链质粒共转染HEK293F细胞,37℃,5%二氧化碳,120rpm细胞摇床表达7天后离心沉淀,收集上清过0.45μm滤器。用50mL平衡缓冲液PBS(pH7.4)平衡琼脂糖亲和介质Protein A层析柱(南京金斯瑞生物科技有限公司)至电脑核酸蛋白检测仪(上海沪西分析仪器厂有限公司)显示吸光度为0。上清上样后加PBS洗涤至吸光度为0,然后用0.1M甘氨酸(pH3.0)洗脱,收集流出液并加入500mM Tris-HCl(pH8.5)缓冲液中中和至pH7.0左右,得到纯化的单克隆抗体3B12、5A1、5E3、4F4、7H1、7G5。

[0042] 实施例10:HRP标记单抗的制备

[0043] 取10mg HRP加0.1mol/L醋酸钠2mL,充分混匀,约5分钟后加0.08 mol/L $NaIO_4$ 溶液1mL,混匀后,室温反应20分钟。加0.4mol/L乙二醇溶液0.5mL,室温静置30分钟后,加21%NaCl溶液0.3mL,再加1.2mL冰冷的无水乙醇沉淀醛化酶,离心去上清,沉淀酶再用6mL 80%冰冷的乙醇溶液浸泡洗涤一次后,离心去除乙醇)。沉淀用0.05mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.6)2mL溶解,然后加入单抗20mg,搅拌均匀,于4℃过夜。次日加10mg $NaBH_4$ 混匀,反应3小时后加等量饱和硫酸铵沉淀酶结合物,4℃搅拌反应30分钟,4℃5000rpm离心分钟,弃上清,沉淀用0.01mol/L PBS 3mL溶解,置透析袋中用0.01mol/L PBS于4℃过夜透析,加3mL无菌甘油,混匀后于-20℃保存。以上述方法分别对3B12、5A1、5E3、4F4、7H1、7G5单抗进行HRP标记。

[0044] 实施例11:配对单抗的筛选

[0045] 六种单克隆抗体(3B12、5A1、5E3、4F4、7H1、7G5)分别经包被液稀释后(终浓度为1μg/mL),以100μL/孔加入酶标板(深圳金灿华实业有限公司),4℃包被12小时后用洗涤液洗涤五次并拍干;加入封闭液,150μL/孔,37℃封闭2小时,弃孔内液体,拍干;分别加入用粪便稀释液处理的感染CDI患者的临床粪便标本和正常粪便标本,100μL/孔,37℃孵育1小时后,洗涤液洗涤五次并拍干;加入100μL实施例9制备得到的HRP标记单抗,100 μL/孔,37℃孵育30分钟后,洗涤液洗涤五次并拍干;每孔加显色液A和显色液B各50μL,37℃避光显色10分钟后,加终止液终止反应,50μL/孔,酶标仪450nm波长空白孔校零后读取OD值。相关溶液配方如下:

[0046] 包被液: Na_2CO_3 1.5g, $NaHCO_3$ 2.9g,加双蒸水定容至1000mL(pH9.6)。

[0047] 封闭液: $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.68g, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.39g, $NaCl$ 8.5g,20g牛血清白蛋白,加双蒸水定容至1000mL(pH7.4)。

[0048] 洗涤液: $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.68g, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.39g, $NaCl$ 8.5g,Tween-20 0.5mL,加双蒸水定容至1000mL(pH7.4)。

[0049] 显色液A:200mg TMB溶于100mL无水乙醇,加双蒸水定容至1000mL。

[0050] 显色液B:柠檬酸2.1g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71g,加双蒸水定容至1000mL。

[0051] 使用时:1mL显色液A+1mL显色液B+0.4μL 30% H_2O_2

[0052] 终止液:2M H_2SO_4 , 21.7mL浓 H_2SO_4 加双蒸水定容至1000mL。

[0053] 以上述方法正交检测各包被单抗与酶标单抗配对,用酶标仪进行检测并记录,求P/N值(阳性标本检测均值与阴性标本检测均值比值),见表1。

[0054] 表1各单抗与酶标单抗P/N值统计

		包被单抗					
		3B12	5A1	5E3	4F4	7H1	7G5
[0055]	3B12-HRP	12.4	5.6	11.8	24.2	7.1	18.5
	酶 5A1-HRP	11.3	4.1	17.7	8.5	10.3	16.8
	标 5E3-HRP	27.5	15.7	10.6	15.2	22.4	12.2
	单 4F4-HRP	18.1	10.8	19.7	7.2	23.9	18.8
	抗 7H1-HRP	9.8	12.9	15.3	22.2	8.1	15.4
[0056]	7G5-HRP	20.1	16.9	9.9	9.2	15.2	6.8

[0057] 通过上表可知,3B12单抗包被与5E3-HRP配对检测CDI为最佳组合。

[0058] SEQ ID N01:抗艰难梭菌GDH特异性单链抗体scfv-3B12轻链可变区氨基酸序列;

[0059] SEQ ID N02:抗艰难梭菌GDH特异性单链抗体scfv-3B12重链可变区氨基酸序列;

[0060] SEQ ID N03:抗艰难梭菌GDH特异性单链抗体scfv-5E3轻链可变区氨基酸序列;

[0061] SEQ ID N04:抗艰难梭菌GDH特异性单链抗体scfv-5E3重链可变区氨基酸序列;

[0062] SEQ ID N05:抗艰难梭菌GDH特异性单链抗体scfv-3B12轻链可变区核苷酸序列;

[0063] SEQ ID N06:抗艰难梭菌GDH特异性单链抗体scfv-3B12重链可变区核苷酸序列;

[0064] SEQ ID N07:抗艰难梭菌GDH特异性单链抗体scfv-5E3轻链可变区核苷酸序列;

[0065] SEQ ID N08:抗艰难梭菌GDH特异性单链抗体scfv-5E3重链可变区核苷酸序列。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 杭州贤至生物科技有限公司
 [0003] <120> 一种艰难梭菌重组蛋白单克隆抗体的制备
 [0004] <160> 8
 [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
 [0006] <210> 1
 [0007] <211> 108
 [0008] <212> PRT
 [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0010] <400> 1
 [0011] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
 [0012] 1 5 10 15
 [0013] Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Tyr Pro Ser
 [0014] 20 25 30
 [0015] Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 [0016] 35 40 45
 [0017] Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 [0018] 50 55 60
 [0019] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 [0020] 65 70 75 80
 [0021] Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Arg
 [0022] 85 90 95
 [0023] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 [0024] 100 105
 [0025] <210> 2
 [0026] <211> 118
 [0027] <212> PRT
 [0028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0029] <400> 2
 [0030] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 [0031] 1 5 10 15
 [0032] Ser Val Glu Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [0033] 20 25 30
 [0034] Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0035] 35 40 45
 [0036] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Tyr Asp Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 [0037] 50 55 60
 [0038] Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0039]	65	70	75	80
[0040]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0041]		85	90	95
[0042]	Thr Arg Gly Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr			
[0043]		100	105	110
[0044]	Val Ser Ser Ala Lys Thr			
[0045]		115		
[0046]	<210> 3			
[0047]	<211> 113			
[0048]	<212> PRT			
[0049]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0050]	<400> 3			
[0051]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly			
[0052]	1	5	10	15
[0053]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Tyr			
[0054]		20	25	30
[0055]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
[0056]		35	40	45
[0057]	Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
[0058]		50	55	60
[0059]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
[0060]	65	70	75	80
[0061]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser			
[0062]		85	90	95
[0063]	Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Gln Leu Glu Leu Lys			
[0064]		100	105	110
[0065]	Arg			
[0066]	<210> 4			
[0067]	<211> 123			
[0068]	<212> PRT			
[0069]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0070]	<400> 4			
[0071]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
[0072]	1	5	10	15
[0073]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr			
[0074]		20	25	30
[0075]	Phe Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Asp Trp Ile			
[0076]		35	40	45
[0077]	Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe			

[0078]	50	55	60
[0079]	Gln Gly Lys Ala Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr		
[0080]	65	70	75 80
[0081]	Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Val Val Tyr Tyr Cys		
[0082]	85	90	95
[0083]	Ala Met Val Ser Thr Gly Gly Leu Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0084]	100	105	110
[0085]	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr		
[0086]	115	120	
[0087]	<210> 5		
[0088]	<211> 324		
[0089]	<212> DNA		
[0090]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0091]	<400> 5		
[0092]	cagatcgtgc tgaccagtc cctgctatc atgtccgctt ctctgggcca gagagtgacc 60		
[0093]	atgacctgta ccgcctccag ttctgtgtac ctttcttacc tgtactggta ccagcagaag 120		
[0094]	cctggctcct ctccaaagct gtggatttac accacatcca acctggcttc tggcgtgcct 180		
[0095]	gcccgtttct ccggcagcgg atctggcaca agctacagcc tgaccatctc ctccatggaa 240		
[0096]	gccgaggatg ccgctacctt ctactgcat cagtaccaca gatccagaac cttcggcgcc 300		
[0097]	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgg 324		
[0098]	<210> 6		
[0099]	<211> 355		
[0100]	<212> DNA		
[0101]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0102]	<400> 6		
[0103]	gaggtgcagc tgcagcagtc cggacctgag ctggtgaagc ccggcgctag cgtcgagatg 60		
[0104]	tcttgcaagg cttctgggta cacctttacc tcctacgtga tgcactgggt caagcagaag 120		
[0105]	cccggccagg gcctggaatg gatcgctat attaatectt acaattacga caccaagtac 180		
[0106]	aacgagaagt tcaaaggcaa ggcctccctc acatctgaca agtcctccag cacagcctac 240		
[0107]	atggaactgt cctccctgac ctctgaggat tccgccgtgt actactgcac cagaggcgga 300		
[0108]	gacttcgact actggggcca aggcaccacc ctcaccgtgt cttctgcca gacca 355		
[0109]	<210> 7		
[0110]	<211> 339		
[0111]	<212> DNA		
[0112]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0113]	<400> 7		
[0114]	gatatcgtga tgaccagac cccactgtcc ctgcctgtgt ctctgggcca ccaggcctct 60		
[0115]	atctcctgca gatcctctca gagcctgggtg cattacaacg gcaacacctt cctgcaactgg 120		
[0116]	tacctgcaga aacctggcca gtctcccaac ctgctgatct acagagtgtc caatagattc 180		

[0117] tctggagtcc cggaccgctt tagcggctct ggatctggca cggacttcac cctgaaaatc 240
[0118] tccagagtgg aagccgagga cctgggcgtg tactttctgt cccaatctac acatgtgcct 300
[0119] ctgaccttcg gcgctggaac acagctggaa ctgaagcgg 339
[0120] <210> 8
[0121] <211> 369
[0122] <212> DNA
[0123] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0124] <400> 8
[0125] gaggtgcagc tgcagcagtc cggagctgag ctggtgaagc ctggagcctc cgtgaagctg 60
[0126] tcctgtaccg cttctggctt caacatcaag gatacatttc tgcactgggt caagcagcgg 120
[0127] cctgagcaag gactggattg gatcgccgg atcgacctg ctaatggcga caccaagtac 180
[0128] gacccaagt tccagggcaa ggccaccgtg accgccgaca cctccagtaa taccgcatac 240
[0129] ctccaactgt cctccctgac ctccgaggac accgtggtgt actactgcgc catggtgtct 300
[0130] accggcggcc tggctctgga ctactggggc caaggcactt ctgtgacagt gtccctccgcc 360
[0131] aaaaccacc 369