



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101004417 B

(45) 授权公告日 2011.08.24

(21) 申请号 200710008426.1

(22) 申请日 2007.01.11

(73) 专利权人 福建农林大学

地址 350000 福建省福州市仓山区建新镇金山学区

专利权人 厦门泰京生物技术有限公司

(72) 发明人 王宗华 汪世华 鲁国东 陈涵

杜晓煜 黄雨墨

(74) 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100

代理人 蔡学俊

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

(56) 对比文件

马颖等. 单链抗体及其在生物学中的应用. 《免疫学杂志》. 2006, 第 22 卷 (第 3 期), 第 S1-S5 页.

William L. Casale et al. enzyme-linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody specific for deoxynivalenol (vomitoxin) and several analogues. 《J. Agric. Food. Chem》. 1988, 第 36 卷第 663-668 页.

Gyu-Ho Choe et al. Cloning, expression, and characterization of single-chain variable fragment antibody against mycotoxin deoxynivalenol in recombinant Escherichia coli. 《Protein Expression and Purification》. 2004, 第 35 卷第 84-92 页.

审查员 曹扣

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

基于单链抗体的脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测方法及其试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种基于单链抗体的脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测方法及其试剂盒, 该检测方法是用所分离的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单链抗体检测相应的毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 采用竞争酶联免疫吸附分析来检测样品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量; 该试剂盒由以下部件构成: 酶标板; 标样; 包被抗体; 单链抗体; 酶标抗原; 清洗液; 底物溶液; 终止液。本发明克服了现有单克隆抗体生产费时费力费钱的不足, 提供一种新的基因工程单链抗体快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇, 该单链抗体可在细菌中大规模生产, 生产更容易、简便和经济, 减少诊断试剂费用; 基于该检测方法的试剂盒, 具有检测快速、灵敏度高、方便快捷, 制造工艺简单、成本低等诸多优点。

1. 一种基于单链抗体的脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测的试剂盒,用所分离的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单链抗体检测相应的毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇;采用竞争酶联免疫吸附分析来检测样品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量,其特征在于:所述试剂盒由以下部件构成:

酶标板 1 块

标样 6 瓶 所述标样为标准品,即脱氧雪腐镰刀菌烯醇

包被抗体 1 瓶 所述包被抗体为抗由 13 个氨基酸组成的标签的抗体,即抗 E-tag 的抗体

抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单链抗体 1 瓶 所述抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单链抗体由 13 个氨基酸组成的标签和抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇的基因工程单链抗体融合获得,所述的 13 个氨基酸组成的标签为 E-tag;所述基因工程单链抗体的氨基酸序列如 SEQ. NO. 1 所示

酶标抗原 1 瓶 脱氧雪腐镰刀菌烯醇-辣根过氧化物酶交联产物

清洗液 2 瓶 磷酸盐缓冲溶液

底物溶液 2 瓶 联苯氨

终止液 2 瓶 $1\text{mol/LH}_2\text{SO}_4$;

其具体检测步骤为:

1) 包被:将所述包被抗体稀释于包被缓冲液中,使其终浓度为 $15\mu\text{g/mL}$,用多通道移液器加入到聚苯乙烯酶标板的微孔中,加入量为 $100\mu\text{L}$ /孔,在温度条件为 4°C 的冰箱中包被过夜;

2) 洗涤:将包被好的酶标板微孔中的液体全部弃去,并用磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次,洗涤方法是先将每个微孔中加入 $300\mu\text{L}$ 洗涤液,放置 3min 后,将微孔中的洗涤液全部倒出,再加入相同体积新的洗涤液,重复所述的洗涤操作,共 3 次;

3) 封闭:向每个微孔中加入 $300\mu\text{L}$ 封闭液,在 37°C 的培养箱中封闭 1h;

4) 洗涤:将酶标板微孔中的液体全部弃去,并用磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次,所述洗涤方法是先将每个微孔中加入 $300\mu\text{L}$ 洗涤液,放置 3min 后,将微孔中的洗涤液全部倒出,再加入相同体积新的洗涤液,重复所述的洗涤操作,共 3 次;

5) 加入抗体:将提取的所述抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单链抗体加入到封闭过的酶标板微孔中,加入量为 $100\mu\text{L}$ /孔,温度条件为 37°C 下温育 1~2h;第一孔作为空白对照,不加抗体,再依次各孔加入不同稀释度的抗体;

6) 洗涤:将酶标板微孔中的液体全部弃去,并用磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次,所述洗涤方法是先将每个微孔中加入 $300\mu\text{L}$ 洗涤液,放置 3min 后,将微孔中的洗涤液全部倒出,再加入相同体积新的洗涤液,重复所述的洗涤操作,共 3 次;

7) 加待检样品和酶标抗原:将脱氧雪腐镰刀菌烯醇-辣根过氧化物酶交联产物和待检样品混匀,将混合液加入微孔中,加入量 $100\mu\text{L}$ /孔,在 37°C 的培养箱中温育 1h;

8) 洗涤:将酶标板微孔中的液体全部弃去,并用洗涤液洗涤 3 次,所述洗涤方法是先将每个微孔中加入 $300\mu\text{L}$ 洗涤液,放置 3min 后,将微孔中的洗涤液全部倒出,再加入相同体积新的洗涤液,重复所述的洗涤操作,共 3 次;

9) 显色:向酶标板的微孔中加入底物溶液, $100\mu\text{L}$ /孔, 37°C 温育 10min 后用终止液终止反应;

10) 记录:用酶标仪读取 $\lambda = 650\text{nm}$ 处的吸光度值 OD_{650} ,并根据吸光度值 OD_{650} 计算所要检测毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量。

基于单链抗体的脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测方法及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及真菌毒素的快速检测法,更具体涉及脱氧雪腐镰刀菌烯醇的基于单链抗体的检测方法及其试剂盒。

背景技术

[0002] 由镰刀菌引起的赤霉病是危害小麦、大麦、燕麦、黑麦、玉米等禾谷类作物的重要病害,在温暖潮湿地区尤为严重。赤霉病不仅导致作物减产,降低谷物品质和食用价值,而且病菌产生的多种毒素能使人畜中毒,对人类和动物的健康造成严重威胁。目前的毒素检测方法有薄层层析法、气液相色谱、质谱、核磁共振和免疫化学等多种方法。酶联免疫吸附检测 (ELISA) 技术是近年来快速发展起来的一项免疫化学新技术,在微量毒物的检测中已得到广泛应用。酶联免疫吸附分析 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, 简称 ELISA) 是将抗体抗原反应的高度特异性、敏感性与酶的高度催化性有机地结合,在不同的载体上进行有毒物质残留分析的方法。

[0003] 目前,用于免疫检测的抗体都是单克隆抗体。单克隆抗体的生产目前都是采用抗原免疫动物,然后利用免疫动物的脾细胞和骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤细胞,最后筛选出具有高抗体活性而又能大量繁殖的杂交瘤细胞。整个生产过程复杂,消耗的时间长,费用高,尤其是它必需要熟练的专业技术人员才能胜任。

[0004] 该发明中的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单链抗体 (scFv) 的制备方法及其检测方法在发表文章中已有记载。见 (汪世华,杜晓煜,黄雨墨,林德书,帕垂科哈特,王宗华. 利用基因工程单链抗体来检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇. 生物技术杂志,2006)。

发明内容

[0005] 本发明是针对上述问题,提供一种基于单链抗体的脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测法及其试剂盒。

[0006] 本发明脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检测方法为:用所分离的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单链抗体检测相应的毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇;采用竞争酶联免疫吸附分析来检测样品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量,其具体检测步骤为:

[0007] 1) 包被:将抗由 13 个氨基酸组成的标签的抗体,即抗 E-tag 的抗体稀释于包被缓冲液中,使其终浓度为 $15 \mu\text{g/mL}$,用多通道移液器加入到聚苯乙烯酶标板的微孔中,加入量为 $100 \mu\text{L/孔}$,在温度条件为 4°C 的冰箱中包被过夜;

[0008] 2) 洗涤:将包被好的酶标板微孔中的液体全部弃去,并用磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次,洗涤方法是先将每个微孔中加入 $300 \mu\text{L}$ 洗涤液,放置 3min 后,将微孔中的洗涤液全部倒出,再加入相同体积新的洗涤液,重复所述的洗涤操作,共 3 次;

[0009] 3) 封闭:向每个微孔中加入 $300 \mu\text{L}$ 封闭液,在 37°C 的培养箱中封闭 1h;

[0010] 4) 洗涤:将酶标板微孔中的液体全部弃去,并用磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次,所述洗涤方法是先将每个微孔中加入 $300 \mu\text{L}$ 洗涤液,放置 3min 后,将微孔中的洗涤液全部倒出,

再加入相同体积新的洗涤液,重复所述的洗涤操作,共 3 次;

[0011] 5) 加入抗体:将提取的融合有 13 个氨基酸组成的标签的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单链抗体加入到封闭过的酶标板微孔中,加入量为 100 μ L/孔,温度条件为 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 ~ 2h;第一孔作为空白对照,不加抗体,再依次各孔加入不同稀释度的抗体;

[0012] 6) 洗涤:将酶标板微孔中的液体全部弃去,并用磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次,所述洗涤方法是先将每个微孔中加入 300 μ L 洗涤液,放置 3min 后,将微孔中的洗涤液全部倒出,再加入相同体积新的洗涤液,重复所述的洗涤操作,共 3 次;

[0013] 7) 加待检样品和酶标抗原:将脱氧雪腐镰刀菌烯醇-辣根过氧化物酶交联产物和待检样品混匀,将混合液加入微孔中,加入量 100 μ L/孔,在 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中温育 1h;

[0014] 8) 洗涤:将酶标板微孔中的液体全部弃去,并用洗涤液洗涤 3 次,所述洗涤方法是先将每个微孔中加入 300 μ L 洗涤液,放置 3min 后,将微孔中的洗涤液全部倒出,再加入相同体积新的洗涤液,重复所述的洗涤操作,共 3 次;

[0015] 9) 显色:向酶标板的微孔中加入底物溶液,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温育 10min 后用终止液终止反应;

[0016] 10) 记录:用酶标仪读取 $\lambda = 650\text{nm}$ 处的吸光度值 OD_{650} ,并根据吸光度值 OD_{650} 计算所要检测的毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量。

[0017] 本发明脱氧雪腐镰刀菌烯醇快速检测法的试剂盒由以下部件构成:

[0018]	孔酶标板	1 块
[0019]	标样	6 瓶(标准品,脱氧雪腐镰刀菌烯醇)
[0020]	包被抗体	1 瓶(抗由 13 个氨基酸组成的标签的抗体,即抗 E-tag 的抗体)
[0021]	单链抗体	1 瓶(融合有 13 个氨基酸组成的标签的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇的基因工程单链抗体)
[0022]	酶标抗原	1 瓶(脱氧雪腐镰刀菌烯醇-辣根过氧化物酶交联产物)
[0023]	清洗液	2 瓶(磷酸盐缓冲溶液)
[0024]	底物溶液	2 瓶(联苯氨, TMB)
[0025]	终止液	2 瓶(1mol/LH ₂ SO ₄)

[0026] 本发明的显著优点是:

[0027] 1) 本发明克服了现有单克隆抗体生产费时费力费钱的不足,提供一种新的基因工程单链抗体快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇。单链抗体(scFv)是用基因工程方法将抗体重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)通过一段连接肽(Linker)连接而成的重组抗体,是保持了亲本抗体的抗原亲和活性和特异性的最小功能性抗体片段,可在细菌中很经济地大规模生产,从而使得免疫检测抗体的生产变得非常容易、简便和经济,进而大大减少诊断试剂的费用。

[0028] 2) 基于该检测方法的试剂盒,具有检测快速、灵敏度高、方便快捷;制造工艺简单、成本低,可以批量生产等诸多优点。

附图说明

[0029] 图 1 为单克隆抗体结构图,图中:1 为重链,2 为轻链,3,4 为抗体的互补决定簇,5

为抗体轻链的恒定区,6 为抗体重链的恒定区,7 为羧基, —COOH,8 为氨基, —NH₂,9 为二硫键。

[0030] 图 2 为抗体可变区的结构图,其中 1 为重链的可变区,2 为轻链的可变区。

[0031] 图 3 为单链抗体的结构图,图中:1 为连接肽链,2 为重链可变区,3 为轻链可变区,两条链的连接方向为重链的 3' 端连接轻链的 5' 端)

[0032] 图 4 为单链抗体的竞争酶联免疫吸附分析法检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇示意图,图中 1 为酶的显色底物联苯氨,2 为待检测的脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒素,3 为融合有 13 个氨基酸组成的标签的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇的基因工程单链抗体,4 为抗由 13 个氨基酸组成的标签的单克隆抗体,即抗 E-tag 的抗体,5 为与辣根过氧化物酶交联的脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒素,6 为酶学显色后给出的肉眼可见的颜色。

[0033] 图 5 是基于单链抗体酶联免疫吸附分析法 (ScFv ELISA) 试剂盒与 Veratox 试剂盒 (美国,Neogen 公司) 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (小麦致呕素),检测结果比较。横坐标表示用单链抗体检测出的脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON) 的浓度,纵坐标表示用 Veratox 试剂盒检测出的脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON) 的浓度,图中的直线表示两种方法检测的回归直线,图中的 $Y = 1.1647X - 0.1662$ 表示两种方法检测的回归方程, $R^2 (1 > R^2 > 0)$ 表示回归性程度,数值越高表示回归性越好,这里的 $R^2 = 0.9596$ 表示回归性好。

具体实施方式

[0034] 该方法的具体检测步骤为:

[0035] 1) 包被:将抗由 13 个氨基酸组成的标签的抗体,即抗 E-tag 的抗体稀释于包被缓冲液中,使其终浓度为 15 μg/mL,用多通道移液器加入到聚苯乙烯酶标板的微孔中,加入量为 100 μL/孔,在温度条件为 4℃ 冰箱中包被过夜;

[0036] 2) 洗涤:将包被好的酶标板微孔中的液体全部弃去,并用磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次,洗涤方法是先将每个微孔中加入 300 μL 洗涤液,放置 3min 后,将微孔中的洗涤液全部倒出,再加入相同体积新的洗涤液,重复所述的洗涤操作,共 3 次;

[0037] 3) 封闭:向每个微孔中加入 300 μL 封闭液,在 37℃ 的培养箱中封闭 1h;

[0038] 4) 洗涤:将酶标板微孔中的液体全部弃去,并用磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次,所述洗涤方法是先将每个微孔中加入 300 μL 洗涤液,放置 3min 后,将微孔中的洗涤液全部倒出,再加入相同体积新的洗涤液,重复所述的洗涤操作,共 3 次;

[0039] 5) 加入抗体:将提取的融合有 13 个氨基酸组成的标签的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单链抗体加入到封闭过的酶标板微孔中,加入量为 100 μL/孔,温度条件为 37℃ 下温育 1 ~ 2h;第一孔作为空白对照,不加抗体,再依次各孔加入不同稀释度的抗体;

[0040] 6) 洗涤:将酶标板微孔中的液体全部弃去,并用磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次,所述洗涤方法是先将每个微孔中加入 300 μL 洗涤液,放置 3min 后,将微孔中的洗涤液全部倒出,再加入相同体积新的洗涤液,重复所述的洗涤操作,共 3 次;

[0041] 7) 加待检样品和酶标抗原:将脱氧雪腐镰刀菌烯醇-辣根过氧化物酶交联产物和待检样品混匀,将混合液加入微孔中,加入量 100 μL/孔,在 37℃ 的培养箱中温育 1h;

[0042] 8) 洗涤:将酶标板微孔中的液体全部弃去,并用洗涤液洗涤 3 次,所述洗涤方法是先将每个微孔中加入 300 μL 洗涤液,放置 3min 后,将微孔中的洗涤液全部倒出,再加入相

同体积新的洗涤液,重复所述的洗涤操作,共 3 次;

[0043] 9) 显色:向酶标板的微孔中加入底物溶液,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C温育 10min 后用终止液终止反应;

[0044] 10) 记录:用酶标仪读取 $\lambda = 650\text{nm}$ 处的吸光度值 OD_{650} ,并根据吸光度值 OD_{650} 计算所要检测的毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量。

[0045] 核苷酸或氨基酸序列表

[0046] <110> 福建农林大学 厦门泰京生物技术有限公司

[0047] <120> 基于单链抗体的脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测方法及其试剂盒

[0048] <160>1

[0049] <210>1

[0050] <211>230

[0051] <212>PRT

[0052] <213> 小白鼠 B1b/c

[0053] <220>

[0054] <223> 该单链抗体为将抗体重链可变区和轻链可变区通过一段连接肽连接而成的重组蛋白。

[0055] <400>1

[0056]

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Asp Tyr Phe Thr

Asn Cys Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Ser Leu Gly Asn Ser Gly Ala Trp Tyr

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Val Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Asp Tyr Tyr Gly Gln Gly Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gln

Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Phe Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr

Arg Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Ala Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Pro Pro Gly Val Pro

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Thr Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala

Leu Trp Tyr Ser Asn His Phe Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

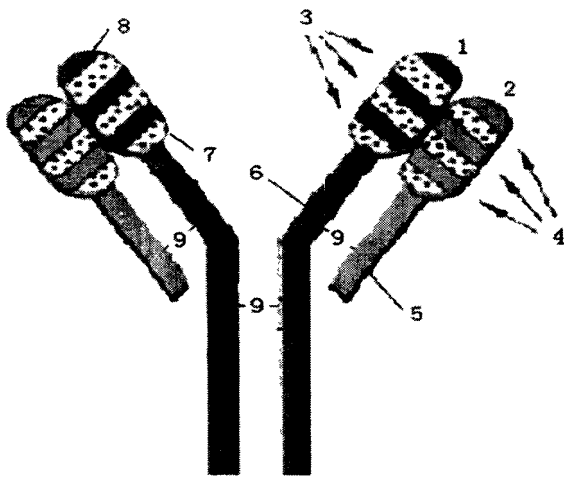


图 1

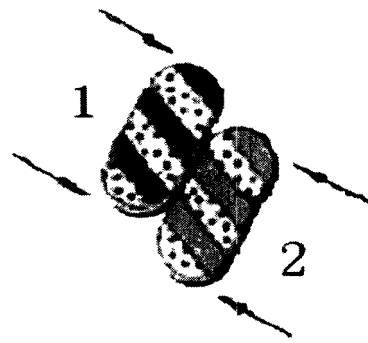


图 2

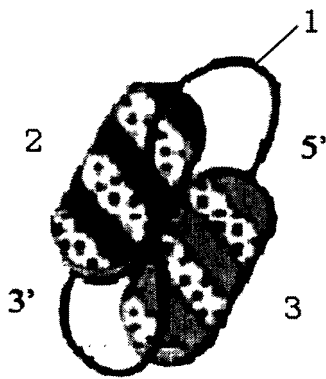


图 3

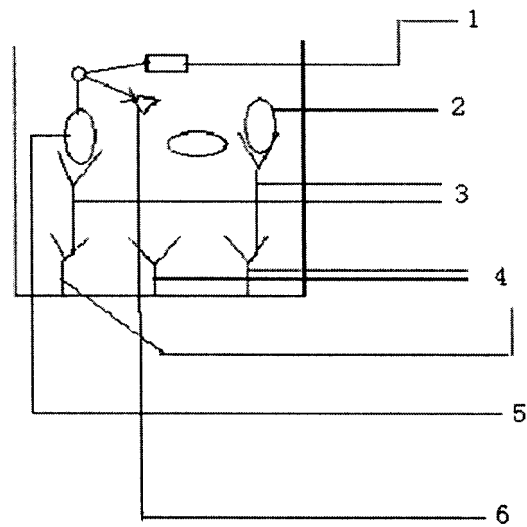


图 4

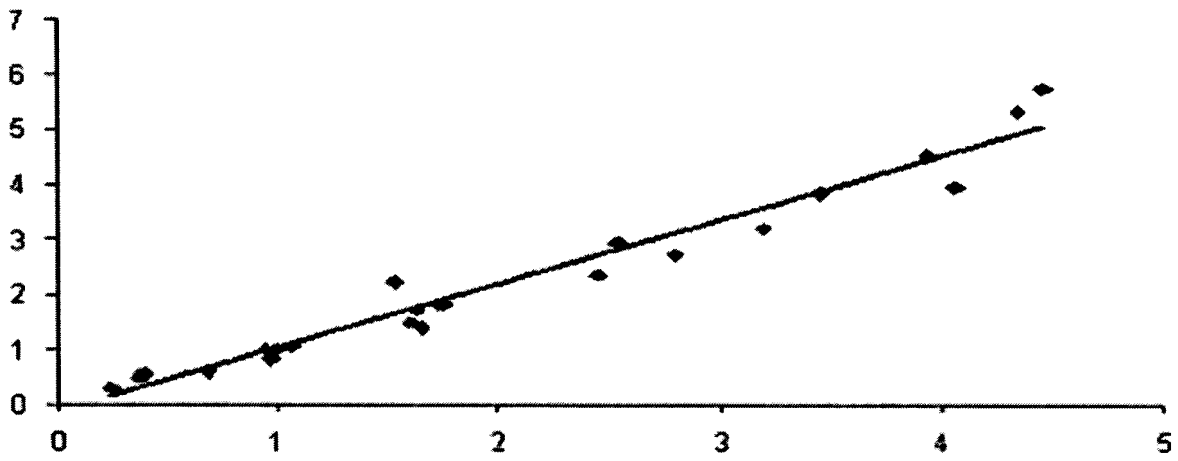


图 5