



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114213543 A

(43) 申请公布日 2022.03.22

(21) 申请号 202111632968.2

C12N 15/85 (2006.01)

(22) 申请日 2021.12.29

(71) 申请人 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 洪淑凡 吴静  
余卫 敖翔

(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

代理人 范琪美

(51) Int. Cl.

C07K 16/40 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页  
序列表4页

(54) 发明名称

抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体、质粒载体及  
方法

(57) 摘要

本发明抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体、质粒载体及方法,提供了一种重组蛋白,该重组蛋白氨基酸序列由犬胰脂肪酶的两个优势表位重复串联组成,并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,化学合成核苷酸序列并构建重组表达载体,从而提高重组蛋白在大肠杆菌中的表达量。本发明还涉及用该重组蛋白免疫小鼠建立噬菌体库,经淘选筛选得到对应cPL单链抗体scfv序列,将得到的scfv序列构建成完整鼠IgG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,通过免疫荧光正交实验确定最佳单抗配对组合。

1. 一种抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体,包括轻链和重链,其特征在于:  
所述轻链的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;  
所述重链的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。
2. 根据权利要求1所述的抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体,其特征在于:  
编码如SEQ ID NO.1所示的所述轻链的可变区氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;  
编码如SEQ ID NO.2所示的所述重链的可变区氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示。
3. 一种质粒载体,其特征在于:该质粒载体含有如SEQ ID NO.5所示的轻链可变区核苷酸序列。
4. 一种质粒载体,其特征在于:该质粒载体含有如SEQ ID NO.6所示的重链可变区核苷酸序列。
5. 一种抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体,包括轻链和重链,其特征在于:  
所述轻链的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示;  
所述重链的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。
6. 根据权利要求5所述的抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体其特征在于:编码如SEQ ID NO.3所示的所述轻链的可变区氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示;  
编码如SEQ ID NO.4所示的所述重链的可变区氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示。
7. 一种质粒载体,其特征在于:该质粒载体含有如SEQ ID NO.7所示的轻链可变区核苷酸序列。
8. 一种质粒载体,其特征在于:该质粒载体含有如SEQ ID NO.8所示的重链可变区核苷酸序列。
9. 一种抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体真核表达质粒载体的方法,包括以下步骤:
  - a) 通过PCR将轻链的可变区核苷酸序列和重链的可变区核苷酸序列分别与鼠IgG轻链恒定区核苷酸序列和重链恒定区核苷酸序列桥接后酶切,并分别连接质粒载体,构建真核细胞表达载体;
  - b) 将步骤a)中真核表达载体转染至HEK293F细胞表达得到抗犬胰脂肪酶单克隆抗体;
  - c) 纯化单克隆抗体,通过免疫荧光正交实验确定最佳单抗配对组合;  
所述轻链的可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示或如SEQ ID NO.7所示;  
所述重链的可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示或如SEQ ID NO.8所示。

## 抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体、质粒载体及方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域。具体的说,涉及一种抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体、质粒载体及方法。

### 背景技术

[0002] 犬胰腺炎是一种胰腺的炎症病症,可分为急性胰腺炎和慢性胰腺炎。其中犬急性胰腺炎有着发病快、病情重的特点,甚至还危及犬类生命。正常情况下,胰腺腺泡中合成的脂肪酶99%分泌入腺腔,只有1%分泌入淋巴管和毛细血管。急性胰腺炎时胰腺腺泡受损导致腺泡内储存的脂肪酶大量释放,胰腺的淋巴管和毛细血管通透性增加,胰脂肪酶大量进入血液,使得血清脂肪酶增高。所以犬胰脂肪酶测定对急性胰腺炎的诊断及鉴别诊断具有重要价值。

### 发明内容

[0003] 为实现上述设计目的,本发明的第一方面,提供了一种抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体,包括轻链和重链,所述轻链的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述重链的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0004] 进一步的,编码如SEQ ID NO.1所示的所述轻链的可变区氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;编码如SEQ ID NO.2所示的所述重链的可变区氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示。

[0005] 本发明的第二方面,提供了一种质粒载体,该质粒载体含有如SEQ ID NO.5所示的轻链可变区核苷酸序列。

[0006] 本发明的第三方面,提供了一种质粒载体,该质粒载体含有如SEQ ID NO.6所示的重链可变区核苷酸序列。

[0007] 本发明的第四方面,提供了一种抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体,包括轻链和重链,所述轻链的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示;所述重链的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0008] 进一步的,编码如SEQ ID NO.3所示的所述轻链的可变区氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示;编码如SEQ ID NO.4所示的所述重链的可变区氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示。

[0009] 本发明的第五方面,提供了一种质粒载体,该质粒载体含有如SEQ ID NO.7所示的轻链可变区核苷酸序列。

[0010] 本发明的第六方面,提供了一种质粒载体,该质粒载体含有如SEQ ID NO.8所示的重链可变区核苷酸序列。

[0011] 本发明的第七方面,提供了一种抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体真核表达质粒载体的方法,包括以下步骤:

[0012] a) 通过PCR将轻链的可变区核苷酸序列和重链的可变区核苷酸序列分别与鼠IgG

轻链恒定区核苷酸序列和重链恒定区核苷酸序列桥接后酶切,并分别连接质粒载体,构建真核细胞表达载体;

[0013] b) 将步骤a) 中真核表达载体转染至HEK293F细胞表达得到抗犬胰脂肪酶单克隆抗体;

[0014] c) 纯化单克隆抗体,通过免疫荧光正交实验确定最佳单抗配对组合;

[0015] 所述轻链的可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示或如SEQ ID NO.7所示;

[0016] 所述重链的可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示或如SEQ ID NO.8所示。

[0017] 本申请的有益之处在于:提供了一种抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体。

### 具体实施方式

[0018] 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。

[0019] 犬胰脂肪酶(Canine Pancreatic Lipase,cPL)优势抗原表位选择

[0020] 以犬胰脂肪酶(cPL)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,序列比较结果显示所选择的A、B两个优势抗原表位序列具备广谱性,是所有犬胰脂肪酶(cPL)的共有表位;并且A、B表位与其它蛋白序列无明显同源性,仅存在于犬胰脂肪酶(cPL)序列。

[0021] 犬胰脂肪酶(cPL)优势抗原表位的串联

[0022] 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,将犬胰脂肪酶(cPL)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。

[0023] 优化编码重组犬胰脂肪酶(cPL)的核苷酸序列

[0024] 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,由通用生物系统安徽有限公司合成。合成后的目的基因克隆于pMD25-T载体(宝生物工程大连有限公司)中。

[0025] 构建重组犬胰脂肪酶(cPL)表达载体

[0026] 将含目的基因的pMD25-T载体和PET-32a(+)载体(德国Novagen公司)通过限制性内切酶BamHI和EcoRI(宝生物工程大连有限公司)分别于37℃双酶切12小时,酶切产物分别进行1%琼脂糖凝胶电泳,并分别切胶回收目的基因和PET-32a(+)载体(本发明所使用的胶回收试剂盒均来自爱思进生物技术杭州有限公司)。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-32a(+)载体按一定的比例于4℃连接12小时后,连接产物转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞(杭州贤至生物科技有限公司),并涂布于含氨苄青霉素抗性(50 $\mu$ 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氨苄青霉素抗性(50 $\mu$ 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提取试剂盒均来自爱思进生物技术杭州有限公司)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。

[0027] 构建重组犬胰脂肪酶(cPL)抗原表达菌株

[0028] 将构建好的重组表达载体转化E.coli ER2566感受态细胞,并涂布于含氨苄青霉素抗性(50 $\mu$ g/mL)的LB平板,于37 $^{\circ}$ C过夜培养。第二日,挑取平板上单克隆菌株至含氨苄青霉素抗性(50 $\mu$ g/mL)的LB液体培养基,37 $^{\circ}$ C恒温摇床培养8小时后,加诱导剂异丙基硫代- $\beta$ -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。12%聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明重组蛋白成功表达,得到重组犬胰脂肪酶(cPL)抗原表达菌株。

[0029] 纯化重组cPL蛋白

[0030] 接种重组cPL蛋白表达菌株至LB液体培养基,加氨苄青霉素至终浓度为50 $\mu$ g/mL,37 $^{\circ}$ C恒温摇床培养8小时后,用含50 $\mu$ g/mL氨苄青霉素的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 $^{\circ}$ C恒温摇床培养至OD600=0.8,加诱导剂异丙基硫代- $\beta$ -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,4度低温超声破菌,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cPL蛋白。

[0031] 单链抗体scfv噬菌体库构建

[0032] 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 $\mu$ g重组cPL蛋白,共400 $\mu$ l/只。20天后进行第二次加强免疫,方法为取80 $\mu$ g重组cPL蛋白用弗氏不完全佐剂乳化,共400 $\mu$ 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 $\mu$ g重组cPL抗原腹腔加强注射,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(北京宝科维食安生物技术有限公司)载体按一定比例于4 $^{\circ}$ C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 $\mu$ g/mL)及2%葡萄糖的2 $\times$ YT-AG平板,于30 $^{\circ}$ C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,此为已构建好的噬菌体抗体库。

[0033] 单链抗体scfv的淘选及筛选

[0034] 从噬菌体抗体库中取一定量的菌液接种到2 $\times$ YT-AG培养液中使OD600为0.3。37 $^{\circ}$ C,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 $^{\circ}$ C,250rpm振荡1h后3300g,4 $^{\circ}$ C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(50 $\mu$ g/mL)及卡那青霉素抗性(50 $\mu$ g/mL)的2 $\times$ YT-AK培养基中,30 $^{\circ}$ C,250rpm振荡培养过夜。次日,10800g,4 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C离心20min沉淀细胞,小心移弃上清,扣干,将沉淀重悬于PBS中,用0.45 $\mu$ m膜过滤去除细菌碎片用于淘选步骤。将纯化的重组cPL抗原用包被液稀释至8 $\mu$ g/ml,包被免疫管(Thermo),每个免疫管4ml,4 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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500μl 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, cPL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, 然后涂布于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:

[0035] 包被: 用包被液稀释cPL重组蛋白至终浓度为1μg/mL, 以100μL/孔加入酶标板(深圳金灿华实业有限公司), 4℃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;

[0036] 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;

[0037] 加样: 加过夜培养的细菌上清及对照血清, 100μL/孔, 37℃孵育1h, 通过洗板机用洗涤液洗涤3次;

[0038] 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;

[0039] 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;

[0040] 终止反应: 以50μL/孔加入终止液;

[0041] 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10个阳性克隆OD值较高, 经测序得到4株scfv序列, 分别为1B3, 2C5, 2H12, 5H7。

[0042] 相关溶液配方如下:

[0043] 包被液:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.5g,  $\text{NaHCO}_3$  2.9g, 加ddH<sub>2</sub>O定容至1000mL (pH9.6)。

[0044] 封闭液:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.68g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.39g, NaCl 8.5g, 20g牛血清白蛋白, 加ddH<sub>2</sub>O定容至1000mL (pH7.4)。

[0045] 洗涤液:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.68g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.39g, NaCl 8.5g, Tween-20 0.5mL, 加ddH<sub>2</sub>O定容至1000mL (pH7.4)。

[0046] 显色液A: 200mg TMB溶于100mL无水乙醇, 加ddH<sub>2</sub>O定容至1000mL。

[0047] 显色液B: 柠檬酸2.1g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71g, 加ddH<sub>2</sub>O定容至1000mL。

[0048] 使用时: 1mL显色液A+1mL显色液B+0.4μL 30% $\text{H}_2\text{O}_2$

[0049] 终止液: 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 21.7mL浓 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 加ddH<sub>2</sub>O定容至1000mL。

[0050] 真核表达载体构建及HEK293F细胞瞬转表达和纯化

[0051] 将4株cPL单链抗体scfv序列分别构建成完整鼠IgG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IgG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将构建好同一抗体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。上清分别上样后加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)缓冲液中和至pH 7.0左右,分别得到纯化的单克隆抗体1B3,2C5,2H12,5H7。

[0052] 标记cPL单克隆抗体荧光微球垫的制备

[0053] 选用直径为190nm的荧光微球(Bangslab公司,Dragongreen),用0.05M pH4.5 MES缓冲液调节微球浓度为1%,然后使用碳二亚胺(EDC)和琥珀酰亚胺(NHS)共价偶联的方式将cPL单克隆抗体标记到荧光微球上,抗体浓度为0.2mg/ml。将制备好的荧光微球使用定量喷膜仪以4 $\mu$ l/cm的量喷涂于荧光微球垫上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h,放于干燥环境备用。

[0054] 硝酸纤维素膜(NC膜)的制备

[0055] 用0.01M pH=7.4PBS(磷酸盐缓冲液,其中包含5%蔗糖和0.05%吐温-20)分别调节cPL单克隆抗体(1B3,2C5,2H12,5H7)至其浓度为0.4mg/mL,将所得溶液分别喷涂在NC膜上形成检测线(T线);用0.01M pH=7.4PBS(磷酸盐缓冲液,其中包含5%蔗糖和0.05%吐温-20)调节羊抗鼠至其浓度为0.5mg/mL,将所得溶液喷涂在NC膜上形成质控区(C线)。两区的喷膜量均为1 $\mu$ L/cm,两区相隔5mm,质控区距离NC膜一端2mm,37 $^{\circ}$ C烘干过夜后,于室温干燥环境下保存备用。

[0056] 荧光微球免疫检测卡的制备

[0057] 组装试纸条:在PVC底板上依次搭接粘贴:(1)喷涂cPL单克隆抗体(1B3,2C5,2H12,5H7)作为检测区和羊抗鼠IgG作为质控区的NC膜;(2)喷涂有荧光微球标记cPL单克隆抗体(1B3,2C5,2H12,5H7)的荧光微球垫;(3)滤纸和样本垫,样本垫为一种经过2%Tween-20处理的玻璃纤维膜;(4)吸水纸,组装完成后剪切成4mm的宽度,装上试剂卡条壳并压紧,即得荧光微球免疫层析检测卡。

[0058] 配对单抗筛选

[0059] 犬cPL临床阳性血清样本及正常血清样本,100 $\mu$ L/孔上样,室温放置15min后,通过荧光分析仪(杭州唯赞科技有限公司)分别读取NC膜上T、C线信号并计算测量值T/(T+C),详见表1、表2。

		包被单抗				
		1B3	2C5	2H12	5H7	
[0060]	荧光微球标记单抗	1B3	0.014	0.314	0.776	0.992
		2C5	0.351	0.007	0.385	0.647
		2H12	0.702	0.865	0.009	0.344
		5H7	0.988	0.453	0.512	0.012

表 2 配对单抗检测犬 cPL 正常血清测量值 T/(T+C)统计						
		包被单抗				
		1B3	2C5	2H12	5H7	
[0061]	荧光微球标记单抗	1B3	0.014	0.018	0.015	0.009
		2C5	0.013	0.007	0.021	0.010
		2H12	0.008	0.016	0.009	0.017
		5H7	0.018	0.007	0.014	0.012

[0062] 通过上表可知5H7单抗包被与1B3单抗标记荧光微球配对为检测cPL的最佳抗体配对。

[0063] 本发明表达了一种新的重组蛋白,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犬胰脂肪酶(cPL)单克隆抗体,并应用于犬急性胰腺炎的早期诊断。

[0064] 为解决传统制备单克隆抗体的不足之处,本申请通过设计、合成重组cPL蛋白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。

[0065] 本申请:(1)以cPL为靶抗原,分析并选择该抗原两个优势抗原表位,序列比较结果显示所选择的两个抗原表位是所有cPL共有表位并与其它蛋白序列无明显同源性。

[0066] (2)为增强免疫效果并缩短单克隆抗体制备时间,将所选择的两个优势抗原表位串联,用其免疫小鼠。

[0067] (3)为提高该重组蛋白表达量,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。

[0068] (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-32a(+),构建重组cPL表达载体。

[0069] (5)重组cPL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。

[0070] (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cPL蛋白。

[0071] (7)重组cPL蛋白多次免疫Ba1b/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cPL蛋白进行多轮淘选筛选最终得到能与重组cPL蛋白结合的单链抗体scfv序列。

[0072] (8)将scfv序列构建成完整鼠IgG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,并分别标记荧光微球。

[0073] (9)正交实验筛选显示5H7单抗包被与1B3单抗标记配对为检测cPL最佳组合。



- [0074] SEQ ID N01:抗犬胰脂肪酶(cPL)特异性单链抗体scfv-5H7轻链可变区氨基酸序列;
- [0075] SEQ ID N02:抗犬胰脂肪酶(cPL)特异性单链抗体scfv-5H7重链可变区氨基酸序列;
- [0076] SEQ ID N03:抗犬胰脂肪酶(cPL)特异性单链抗体scfv-1B3轻链可变区氨基酸序列;
- [0077] SEQ ID N04:抗犬胰脂肪酶(cPL)特异性单链抗体scfv-1B3重链可变区氨基酸序列;
- [0078] SEQ ID N05:抗犬胰脂肪酶(cPL)特异性单链抗体scfv-5H7轻链可变区核苷酸序列;
- [0079] SEQ ID N06:抗犬胰脂肪酶(cPL)特异性单链抗体scfv-5H7重链可变区核苷酸序列;
- [0080] SEQ ID N07:抗犬胰脂肪酶(cPL)特异性单链抗体scfv-1B3轻链可变区核苷酸序列;
- [0081] SEQ ID N08:抗犬胰脂肪酶(cPL)特异性单链抗体scfv-1B3重链可变区核苷酸序列;



35

40

45

Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85

90

95

[0083]

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100

105

110

Arg

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;223&gt; scfv-5H7 重链可变区氨基酸序列



Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Ser Val Ser Ser

115

120

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> scfv-1B3 轻链可变区氨基酸序列

<400> 3

Ala Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1

5

10

15

[0085]

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ala

20

25

30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Trp Thr Phe Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser



Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50

55

60

Ser Arg Leu Asn Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65

70

75

80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Val His Gly Asn Tyr Gly Leu Gly Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp

[0087]

100

105

110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 339

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;223&gt; scfv-5H7 轻链可变区核苷酸序列

&lt;400&gt; 5

gacgtgctga tgaccagac ccctctgtcc ctgcctgtgt ctctgggcga ccaggcctct 60  
 atctctgca gatcctccca aaacatcgtg cattccagcg gcaacaccta tctggaatgg 120  
 tacctgcaga aatctggcca gtctcctaag cctctgatct acaaggtgag caacagattc 180  
 agcggagtcc ctgaccggtt ttccgatct ggctctggca ccaactcac cctgaaaatc 240  
 tctagagtgg aagccgagga cctgggcgtg tactactgct tccagggcag ccatgtgcc 300  
 ctgacctcg                    gcggcggcac                    taagctggaa                    ctgaagagg  
 339

[0088] <210> 6  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <223> scfv-5H7 重链可变区核苷酸序列

<400> 6  
 gaagtgatgc tggaggcga ctcgtgaagc ccggcggaag cctgaagatc 60  
 tcttgegcag cctctggctt caccttcage tcttacgcca tgtcttgggt gcggcagacc 120  
 cctgaaaage ggctggaatg ggtcgtacc atcacctccg gcggatctta caccttctac 180  
 cctgactccg tgaagggcag atcaccatc ttacagaca acgccaagaa taccctgtac 240



ctgcagatgt cttcctgag atccgaggat accgctatgt actactgcgc cagacggaac 300

agcagtagct actacggctc tagcctgttc gaccactggg gccagggcac cacctgtcc 360

gtgtcttct

369

<210> 7

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> scfv-1B3 轻链可变区核苷酸序列

[0089]

<400> 7

gccatcgtga tgaccagag ccataagttc atgtccacat ccgtgggcca tcgcgtgtcc 60

atcacctgca aggcctctca ggacgtggac accgccgtgg cctggtacca gcagaagcct 120

ggccagtctc ctaagctgct gatctactgg acctttaca gacacaccgg cgtccccgac 180

agattcaccg gctctggctc cggcaccgac ttcacactga ccattccaa cgtgcagagc 240

gaagacctgg ccgactactt ctgccaccag tactccagat accctctgac ctccggcggc 300

ggcaccaacc

tggaaatcaa

gcgg

324

<210> 8

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> scfv-1B3 重链可变区核苷酸序列

<400> 8

caagtgcagc tgaaagagtc cggacctggc ctctgtggccc ctctcagag cctgtccatc 60

acctgtaccg tgtctggcct cagcctgacc ggctctggcg tcaactggat cagacagccc 120

[0090]

cctggcaagg gcctggaatg gctgggcatg atctggggcg acgatctac cgactacaac 180

tctgccctga agtcccggct gaacatccgg aaggacaact ctaagtccca ggtgtttctg 240

aaaatgaact cctgcagac cgacgacacc gccaggtact actgcgcccc ggtccacggc 300

aactacggcc tgggcaattg gtacttcgac gtttggggcg ctggcaccac cgtgaccgtg 360

tcctct

366

## 序列表

<110> 杭州贤至生物科技有限公司

<120> 抗犬胰脂肪酶特异性单链抗体、质粒载体及方法

<130> 20211025

<160> 8

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

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

```

Arg

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
           20           25           30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val

```

50	55	60																
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Phe	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr			
65					70					75				80				
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys			
				85						90				95				
Ala	Arg	Arg	Asn	Ser	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Phe	Asp	His			
			100						105					110				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Ser								
	115								120									

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 3

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

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 4

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln			
1				5					10					15				
Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Gly	Ser			
			20						25					30				
Gly	Val	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu			
			35				40							45				

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Asn Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Val His Gly Asn Tyr Gly Leu Gly Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
 100 105 110  
 Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 5

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

gacgtgctga tgaccagac ccctctgtcc ctgcctgtgt ctctgggcga ccaggcctct 60  
 atctcctgca gatcctccca aacatcgtg cattccagcg gcaacaccta tctggaatgg 120  
 tacctgcaga aatctggcca gtctcctaag cctctgatct acaaggtgag caacagattc 180  
 agcggagtcc ctgaccggtt ttccgatct ggctctggca ccaacttcac cctgaaaatc 240  
 tctagagtgg aagccgagga cctgggcgtg tactactgct tccagggcag ccatgtgccc 300  
 ctgaccttcg gcggcggcac taagctgga ctgaagagg 339

<210> 6

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 6

gaagtgatgc tggatgaatc tggaggcggc ctcgtgaagc ccggcggcga cctgaagatc 60  
 tcctgcgcag cctctggctt caccttcagc tcctacgcc tgtcttgggt gcggcagacc 120  
 cctgaaaagc ggctggaatg ggtcgtacc atcacctccg gcgatctta caccttctac 180  
 cctgactccg tgaagggcag attcaccatc ttcagagaca acgccaagaa taccctgtac 240  
 ctgcagatgt cttccctgag atccgaggat accgctatgt actactgcgc cagacggaac 300  
 agcagtagct actacggctc tagcctgttc gaccactggg gccagggcac caccctgtcc 360  
 gtgtcttct 369

<210> 7

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7

gccatcgtga tgaccagag ccataagttc atgtccacat ccgtgggcga tcgctgtcc 60

atcacctgca aggcctctca ggacgtggac accgcegtgg cctggtacca gcagaagcct 120  
ggccagtctc ctaagctgct gatctactgg acctttacaa gacacaccgg cgtccccgac 180  
agattcaccg gctctggctc cggcaccgac ttcaactga ccatctccaa cgtgcagagc 240  
gaagacctgg ccgactactt ctgccaccag tactccagat accctctgac cttcggcggc 300  
ggcaccaacc tggaaatcaa gcgg 324

<210> 8

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

caagtgcagc taaaagagtc cggacctggc ctctgtggccc cttctcagag cctgtccatc 60  
acctgtaccg tgtctggett cagcctgacc ggctctggcg tcaactggat cagacagccc 120  
cctggcaagg gcctggaatg gctgggcatg atctggggcg acggatctac cgactacaac 180  
tctgccctga agtcccggct gaacatccgg aaggacaact ctaagtccca ggtgtttctg 240  
aaaatgaact ccctgcagac cgacgacacc gccaggtact actgcgcccg ggtccacggc 300  
aactacggcc tgggcaattg gtacttcgac gtttggggcg ctggcaccac cgtgaccgtg 360  
tcctct 366