



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109738645 A

(43)申请公布日 2019.05.10

(21)申请号 201811597037.1

(22)申请日 2018.12.26

(71)申请人 山东宽和正生物医药有限公司

地址 262700 山东省潍坊市寿光市文圣街
南兴安路西潍坊科技学院

(72)发明人 董金华 董航 单喜军

(74)专利代理机构 山东济南齐鲁科技专利事务
所有限公司 37108

代理人 张娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

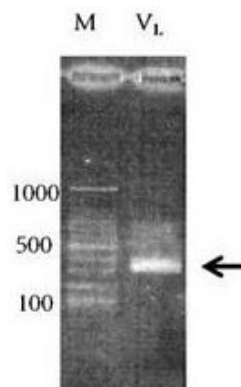
权利要求书3页 说明书9页
序列表17页 附图4页

(54)发明名称

一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶
联免疫分析方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,分别调制抗体的轻链可变区或轻链可变区与其他蛋白的融合蛋白、重链可变区或重链可变区与噬菌体的融合体、或重链可变区与酶的融合蛋白,利用抗体的轻链可变区和重链可变区同时作用盐酸克伦特罗形成稳定复合体的原理,对盐酸克伦特罗进行检测;本发明检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,不需要在酶标板上包被盐酸克伦特罗与牛血清蛋白的偶联物或制备盐酸克伦特罗与酶的偶联物,大大降低了检测成本,具有检测速度快,灵敏度高,准确度高,易于实施,检测成本低等优点。



1. 一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,其特征在于:分别调制抗体的轻链可变区或轻链可变区与其他蛋白的融合蛋白质、重链可变区或重链可变区与噬菌体的融合体、或重链可变区与酶的融合蛋白,利用抗体的轻链可变区和重链可变区同时作用盐酸克伦特罗形成稳定复合体的原理,对盐酸克伦特罗进行检测;

其中抗体重链可变区的氨基酸序列为:

EVNLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTFYPDSVKGRFTISR
DNAKNTLYLQMSSLRSED TAMYYCASDDYKDYFDYWGQGTTLTV;

抗体轻链可变区的氨基酸序列为:

ENVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSNTPKLIYDTSKLSAGVPGRFSGSGSGNSYSL
TISSMEAEDVATYYCFQGSQYPFTFGSGTKLEIKR。

2. 一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,其特征在于:分别调制抗体的轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白质、重链可变区与噬菌体的融合体,利用抗体的轻链可变区和重链可变区同时作用盐酸克伦特罗形成稳定复合体的原理,对盐酸克伦特罗进行检测。

3. 根据权利要求2所述的一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,其特征在于:包括以下步骤:

①构建抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白;

抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白的基因序列为:

ATGAAAATAAAAACAGGTGCACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAACGACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCT
CTCGCCAAAATCGAAGAAGGTAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAGTCG
GTAAGAAATTTCGAGAAAGATACCGGAATTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTCCCACA
GGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGC
CTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACA
ACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGCTGCCGAACCC
GCCAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAAC
CTGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGT
ACGACATTAAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGTTGACCTGATTAATAA
CAAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATC
AACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAACGGTACTGCCGACCTTCAAGG
GTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAA
AGAGTTCTCGAAAACCTATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTA
GCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACCATGGAAAACGCCAGAAAGGTG
AAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGG
TCGTCAGACTGTGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAATAACAATAAC
AACAACCTCGGGATCGAGGGAAGGATTTAGAATTTCGCGTCGACGGAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCA
TGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCA
GCAGAAGTCAAACACCTCCCCAACTCTGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTGCGTTCT
AGTGGCAGTGGGTCTGGAACTCTTACTCTCTCACGATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTATTACT
GTTTTAGGGGAGTGGGTACCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAACGTGCGGCCGCACATCA

TCATCACCATCACGGGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCA;

②构建抗体重链可变区与噬菌体pIII蛋白的融合体;

抗体重链可变区与噬菌体pIII蛋白的融合体的基因序列为:

ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTG
AACCTGGTGGAATCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA
CTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAG
TGGTGGTAGTTACACCTTCTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACC
CTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGCGATGATTACAAGGACT
ACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCGAGCTCACCGGCGTCGGCCGCACATCATCATACCA
TCACGGGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTTGAAAGTTGTTTA
GCAAAACCTCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAACTATG
AGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTGGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTTACGGTACATGGGTTCC
TATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGT
GGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGCACTT
ATCCGCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTTTTCAT
GTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGTGCATTAAGTGTATACGGGCACTGTTACTCAAGGCACTGAC
CCCGTTAAAACCTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAATTCA
GAGACTGCGCTTTCATTCTGGCTTTAATGAGGATCCATTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCC
TCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGT
GGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGCTCCGGTCCGGTGATTTTGATTATGAAA
AAATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAA
ACTTGATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGT
AATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCTCAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAA
TGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCTTTGCCTCAGTCGGTTGAATGTCGCCCTTATGTCTTTGGCGCTGGTAA
ACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAATTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCC
ACCTTTATGTATGATTTTTCGACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCT;

③在96孔酶标板上包被抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白,洗板后加入显示了抗体重链可变区的噬菌体和不同浓度的盐酸克伦特罗;再次洗板后并向酶标板内加入酶标记的抗噬菌体抗体,反应完成后,洗板,加入酶的底物显色,测定吸光度;绘制盐酸克伦特罗浓度与吸光度的标准曲线,利用标准曲线测定样品中盐酸克伦特罗的含量。

4. 根据权利要求3所述的一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,其特征在于:步骤①构建抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白的具体操作为:通过执行PCR扩增抗体A2轻链的可变区,PCR反应以A2抗体基因为模板,反应引物为抗体轻链特异引物,引物两端分别附加了SalI和NotI限制酶切点,使用限制酶分别处理扩增的抗体轻链和蛋白表达载体pMAL并纯化,使用T4DNA连接酶将两者连接,转化大肠杆菌XL10-Gold,过夜培养,执行菌簇PCR,筛选阳性克隆,培养后抽取质粒,并对插入载体的基因进行测序确认。

5. 根据权利要求3所述的一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,其特征在于:步骤②构建抗体重链可变区与噬菌体的融合体的具体操作步骤为:通过执行

PCR扩增抗体A2重链可变区基因,PCR反应以A2抗体基因为模板,反应引物为抗体重链特异引物,引物两端分别附加了NcoI和XhoI限制酶切点,使用限制酶分别处理扩增的抗体重链和噬菌体展示载体pDong10S并纯化,使用T4DNA连接酶将两者连接,转化大肠杆菌TG-1,培养8~12小时,执行菌簇PCR,筛选阳性克隆,培养后抽取质粒,并对插入载体的基因进行测序确认;

挑单克隆阳性菌落至4mL含有100 μ g/mL氨苄青霉素的2YT培养基,37 $^{\circ}$ C过夜培养,取1mL过夜培养菌液至100mL的含有同样抗生素的2YT培养液,37 $^{\circ}$ C培养大肠杆菌至OD₆₀₀约为0.4时,加入辅助噬菌体,37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,离心去除上清,加入100mL新鲜的含有氨苄青霉素(100 μ g/mL)及卡那霉素(50 μ g/mL)的2YT培养基,悬浮大肠杆菌细胞,30 $^{\circ}$ C过夜培养。次日,离心培养液分离培养上清和大肠杆菌细胞,取80mL的上清至一个新的容器,加入20mL的PEG/NaCl溶液,冰上放置30分钟后,离心,弃上清,用2mL的PBS溶液将沉淀溶解,作为显示了抗体重链可变区的噬菌体。

6. 根据权利要求3所述的一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,其特征在于:标记噬菌体抗体的酶为辣根过氧化酶或碱性磷酸酯酶,其中辣根过氧化酶对应的酶底物分别是3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐、碱性磷酸酯酶的酶底物为4-硝基苯磷酸二钠盐。

7. 根据权利要求3所述的一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,其特征在于:步骤③中制备标准曲线的具体操作步骤为:在96孔酶标板的孔内加入100 μ L,5 μ g/mL抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白,在3~5 $^{\circ}$ C下静置,8~12小时后去掉孔内的液体,加入200 μ L 2%脱脂奶粉溶液,20~30 $^{\circ}$ C下放置两个小时,对酶标板进行封闭;洗板后向微孔内加入100 μ L含有显示了抗体重链可变区的噬菌体及各种浓度盐酸克伦特罗的溶液,在25 $^{\circ}$ C孵育1小时,去除孔内溶液,用含有0.1%吐温的PBS溶液洗涤酶标板,加入浓度为1 μ g/mL,标记了酶的抗噬菌体抗体溶液,在25 $^{\circ}$ C下孵育1小时,去除孔内溶液,用含有0.1%吐温的PBS溶液洗板,最后加入酶底物显色,测定孔内溶液的吸收度,制作标准曲线。

8. 根据权利要求7所述的一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,其特征在于:标记噬菌体抗体的酶为辣根过氧化酶或碱性磷酸酯酶,当酶为辣根过氧化酶时,对应的酶底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐,测定吸光度时的可见光波长为450nm;当酶为碱性磷酸酯酶时,对应的酶底物为4-硝基苯磷酸二钠盐,测定吸光度时的可见光波长为405nm。

一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检测盐酸克伦特罗含量技术领域,具体说是一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法。

背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗是一种 β_2 受体激动剂,属于拟肾上腺素类药物,能够改善动物体内的代谢途径,促进肌肉特别是骨骼肌中蛋白质的合成,抑制脂肪的合成,从而加快生长速度,但是盐酸克伦特罗摄入过量会引起巨大的不良反应,严重者发生急性中毒、甲亢,甚至心律失常等,因此盐酸克伦特罗的含量需要进行检测,液相色谱法、气相色谱法是常规的检测盐酸克伦特罗含量的检测方法,但是,这类检测方法需要昂贵的设备,很难普及使用,本领域人员为了降低检测成本,采用免疫测定法检测盐酸克伦特罗的含量,在免疫测定方法的开发中,竞争法酶联免疫分析技术是目前比较常用的方法。

[0003] 竞争法酶联免疫分析技术检测盐酸克伦特罗含量包括盐酸克伦特罗和酶标盐酸克伦特罗竞争与固相抗体结合,因此结合于固相的酶标盐酸克伦特罗的量与受检样品中盐酸克伦特罗的量呈反比,其操作步骤包括:(1)将特异抗体与固相载体连接,形成固相抗体,洗涤。(2)待测管中加受检标本和一定量酶标盐酸克伦特罗的混合溶液,使之与固相抗体反应,如受检标本中无盐酸克伦特罗,则酶标盐酸克伦特罗能顺利地与固相抗体结合;如受检标本中含有盐酸克伦特罗,则与酶标盐酸克伦特罗以同样的机会与固相抗体结合,竞争性地占去了酶标盐酸克伦特罗与固相抗体结合的机会,使酶标盐酸克伦特罗与固相抗体的结合量减少;参考管中只加酶标盐酸克伦特罗,保温后,酶标盐酸克伦特罗与固相抗体的结合可达最充分的量,洗涤。(3)加底物显色:参考管中由于结合的酶标克伦特罗最多,故颜色最深。参考管颜色深度与待测管颜色深度之差,代表受检标本中盐酸克伦特罗的量,待测管颜色越淡,表示标本中盐酸克伦特罗的含量越多。抗原抗体的线性关系来最终确定体系的最终检测目标的浓度。

[0004] 竞争法酶联免疫分析技术虽然比使用大型仪器的分析方法简便,但是仍然具有较多的操作步骤,由于其原理是利用两种形式的同种抗原(小分子抗原和其与大分子物质连接的小分子抗原)竞争性的与抗体结合,并且其灵敏度和检测范围受抗体亲和力的影响较大,并且检测范围通常在数十至几千ng/ml,检测的浓度范围窄。

[0005] 竞争法酶联免疫分析技术对盐酸克伦特罗进行检测时,也可在酶标板上包被盐酸克伦特罗与牛血清蛋白的偶联物BSA-CLEN,然后使标本中的游离盐酸克伦特罗与包被的偶联物竞争性地与抗盐酸克伦特罗抗体结合,最后通过测定跟包被偶联物结合的抗体的量来计算标本中盐酸克伦特罗的含量。不管基于以上哪一种检测形式,制备盐酸克伦特罗与酶的偶联物或BSA-CLEN,都需要很高的成本,从而导致竞争法酶联免疫分析的成本也较高。

发明内容

[0006] 为解决上述问题,本发明的目的是提供一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶

联免疫分析方法。

[0007] 本发明为实现上述目的,通过以下技术方案实现:

[0008] 一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,分别调制抗体的轻链可变区或轻链可变区与其他蛋白的融合蛋白质、重链可变区或重链可变区与噬菌体的融合体、或重链可变区与酶的融合蛋白,利用抗体的轻链可变区和重链可变区同时作用盐酸克伦特罗形成稳定复合体的原理,对盐酸克伦特罗进行检测;

[0009] 其中重链可变区的氨基酸序列为:

[0010] EVNLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTFYPDSVKGRF
TISRDNAKNTLYLQMSSLRSED TAMYYCASDDYKDYFDYWGQGTTLTV;

[0011] 轻链可变区的氨基酸序列为:

[0012] ENVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSNTSPKLWIYDTSKLSGVPGRFSGSGSGN
SYSLTISSMEAEDVATYYCFQGSQYPFTFGSGTKLEIKR。

[0013] 优选的,分别调制抗体的轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白质、重链可变区与噬菌体的融合体,利用抗体的轻链可变区和重链可变区同时作用盐酸克伦特罗形成稳定复合体的原理,对盐酸克伦特罗进行检测。

[0014] 优选的检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,包括以下步骤:

[0015] ①构建抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白;

[0016] 抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白的基因序列为:

[0017] ATGAAAATAAAACAGGTGCACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAACGACGATGATGTTTTCCGCTCG
GCTCTCGCCAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAGT
CGGTAAGAAATTCGAGAAAGATACCGGAATTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGATAAACTGGAAGAGAAATTTCCAC
AGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGC
CTGTTGGCTGAAATCACCCCGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAA
CGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGCTGCCGAACCCGC
CAAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTG
CAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGA
CATTAAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGTTGACCTGATTA AAAACAAAC
ACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGC
CCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAACGGTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAACC
ATCCAAACCGTTTCGTTGGCGTGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAAGAGTTCC
TCGAAAACCTATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAG
TCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACCATGGAAAACGCCAGAAAGGTGAAATCATGCC
GAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGGTGCTCAGACTG
TCGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAATAACAATAACAACAACCTCGGG
ATCGAGGGAAGGATTTTCAAGATTCGCGTCGACGGAAAAATGTGCTCACCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCC
AGGGGAAAAGGTACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAAACA
CCTCCCCAAACTCTGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTCGCTTCACTGGCAGTGGGTCT
GGAACTCTTACTCTCTACGATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTATTACTGTTTTTCAGGGGAGTGG
GTACCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGAAAATAAAACGTGCGGCCGCACATCATCATCACCATCACGGGG

CCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCA

[0018] ②构建抗体重链可变区与噬菌体pIII蛋白的融合体；

[0019] 抗体重链可变区与噬菌体pIII蛋白的融合体的基因序列为：

[0020] ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTACTCTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGA
GGTGAACCTGGTGAATCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCTGTGCAGCCTCTGGA
TTCACCTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCAACCATT
GTAGTGGTGGTAGTTACACCTTCTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAA
CACCTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGCGATGATTACAAG
GACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCGAGCTCACCGGCGTCGGCCGCACATCATCATC
ACCATCACGGGGCCGCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTTGAAAGTTG
TTTAGCAAAACCTCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAAC
TATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTGGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTTACGGTACATGGG
TTCCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGA
GGGTGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGC
ACTTATCCGCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTT
TCATGTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGTGCATTAAGTGTATACGGGCACTGTTACTCAAGGCAC
TGACCCCGTTAAAACTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAA
TTCAGAGACTGCGCTTTCATTCTGGCTTTAATGAGGATCCATTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACC
TGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGCTCTGA
GGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGCTCCGGTCCGGTGATTTTGATTAT
GAAAAATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAG
GCAAACCTTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAA
TGGAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCTCAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCT
TTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCTTTGCCTCAGTCGGTTGAATGTCGCCCTTATGTCTTTGGCGCTG
GTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAATTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGT
TGCCACCTTTATGTATGATTTTTCGACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCT；

[0021] ③在96孔酶标板上包被抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白，洗板后加入显示了抗体重链可变区的噬菌体和不同浓度的盐酸克伦特罗；再次洗板并向酶标板内加入酶标记的抗噬菌体抗体，反应完成后，洗板，加入酶的底物显色，测定吸光度；绘制盐酸克伦特罗浓度与吸光度的标准曲线，利用标准曲线测定样品中盐酸克伦特罗的含量。

[0022] 优选的，步骤①构建抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白的具体操作为：通过执行PCR扩增抗体A2轻链的可变区，PCR反应以A2抗体基因为模板，反应引物为抗体轻链特异引物，引物两端分别附加了SalI和NotI限制酶切点，使用限制酶分别处理扩增的抗体轻链和蛋白表达载体pMAL并纯化，使用T4 DNA连接酶将两者连接，转化大肠杆菌XL10-Gold，过夜培养，执行菌簇PCR，筛选阳性克隆，培养后抽取质粒，并对插入载体的基因进行测序确认。

[0023] 优选的，步骤②构建抗体重链可变区与噬菌体的融合体的具体操作步骤为：通过执行PCR扩增抗体A2重链可变区基因，PCR反应以A2抗体基因为模板，反应引物为抗体重链特异引物，引物两端分别附加了NcoI和XhoI限制酶切点，使用限制酶分别处理扩增的抗体

重链和噬菌体展示载体pDong10S并纯化,使用T4 DNA连接酶将两者连接,转化大肠杆菌TG-1,培养8~12小时,执行菌簇PCR,筛选阳性克隆,培养后抽取质粒,并对插入载体的基因进行测序确认;

[0024] 挑单克隆阳性菌落至4mL含有100 μ g/mL氨苄青霉素的2YT培养基,37 $^{\circ}$ C过夜培养,取1mL过夜培养菌液至100mL的含有同样抗生素的2YT培养液,37 $^{\circ}$ C培养大肠杆菌至OD₆₀₀约为0.4时,加入辅助噬菌体,37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,离心去除上清,加入100mL新鲜的含有氨苄青霉素(100 μ g/mL)及卡那霉素(50 μ g/mL)的2YT培养基,悬浮大肠杆菌细胞,30 $^{\circ}$ C过夜培养,次日,离心培养液分离培养上清和大肠杆菌细胞,取80mL的上清至一个新的容器,加入20mL的PEG/NaCl溶液,冰上放置30分钟后,离心,弃上清,用2mL的PBS溶液将沉淀溶解,作为显示了抗体重链可变区的噬菌体。

[0025] 优选的,标记噬菌体抗体的酶为辣根过氧化酶或碱性磷酸酯酶,其中辣根过氧化酶对应的酶底物分别是3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐、碱性磷酸酯酶的酶底物为4-硝基苯磷酸二钠盐。

[0026] 优选的,步骤③中制备标准曲线的具体操作步骤为:在96孔酶标板的孔内加入100 μ L,5 μ g/mL抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白,在3~5 $^{\circ}$ C下静置,8~12小时后去掉孔内的液体,加入200 μ L 2%脱脂奶粉溶液,20~30 $^{\circ}$ C下放置两个小时,对酶标板进行封闭;洗板后向微孔内加入100 μ L含有显示了抗体重链可变区的噬菌体及各种浓度盐酸克伦特罗溶液,在25 $^{\circ}$ C孵育1小时,去除孔内溶液,用含有0.1%吐温的PBS溶液洗涤酶标板,加入浓度为1 μ g/mL,标记了酶的抗噬菌体抗体溶液,在25 $^{\circ}$ C下孵育1小时,去除孔内溶液,用含有0.1%吐温的PBS溶液洗板,最后加入酶底物显色,测定孔内溶液的吸收度,制作标准曲线。

[0027] 进一步优选的,标记噬菌体抗体的酶为辣根过氧化酶或碱性磷酸酯酶,当酶为辣根过氧化酶时,对应的酶底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐,测定吸光度时的可见光波长为450nm;当酶为碱性磷酸酯酶时,对应的酶底物为4-硝基苯磷酸二钠盐,测定吸光度时的可见光波长为405nm。

[0028] 本发明相比现有技术具有以下优点:

[0029] 本发明检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,先采用麦芽糖结合蛋白与抗体轻链可变区的基因连接为一个开放阅读框,后通过大肠杆菌来制作融合蛋白;然后构建抗体重链可变区与噬菌体的融合体,可以非竞争性的测定盐酸克伦特罗的浓度,使其检测不受抗体亲和力的影响,能测定的盐酸克伦特罗的浓度比竞争法更广,灵敏度高,操作步骤少;采用本发明检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,能检测到盐酸克伦特罗的最低量为1ng/ml,灵敏度为1ng/ml,检测范围为1~10000ng/ml,大大提高了盐酸克伦特罗的检测范围。

[0030] 本发明检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法,不需要在酶标板上包被盐酸克伦特罗与牛血清蛋白的偶联物或制备盐酸克伦特罗与酶的偶联物,大大降低了检测成本,具有检测速度快,灵敏度高,准确度高,易于实施,检测成本低等优点。

附图说明

[0031] 图1为利用PCR扩增抗体轻链可变区基因的琼脂糖电泳图;

- [0032] 图2为构建的表达抗体轻链可变区载体的结构图；
- [0033] 图3纯化前后蛋白质的电泳结果图；
- [0034] 图4为利用PCR扩增抗体重链可变区基因的琼脂糖电泳图；
- [0035] 图5为构建的呈递抗体重链可变区载体的结构图；
- [0036] 图6为呈递了抗体重链可变区的噬菌体示意图；
- [0037] 图7为检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法的原理示意图；
- [0038] 图8为检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法的的标准曲线。
- [0039] 附图标记：
- [0040] 1抗体重链可变区，2噬菌体，3盐酸克伦特罗，4抗体轻链可变区，5麦芽糖结合蛋白。

具体实施方式

[0041] 本发明的目的是提供一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法，通过以下技术方案实现：

[0042] 一个抗体分子是由两条重链和两条轻链组成，其中重链从氨基末端开始分为可变区(V_H)和三个恒定区(C_{H1} , C_{H2} , C_{H3})，而轻链分为可变区(V_L)和一个恒定区(C_L)。和抗原直接结合的部分为 V_H 和 V_L 这两个区，而其他的几个区决定抗体的种类，传统的免疫检测中，一般都是利用一个抗体分子，而本专利则是只利用抗体的重链可变区和轻链可变区。

[0043] 分别调制抗体的轻链可变区或轻链可变区与其他蛋白的融合蛋白质、重链可变区或重链可变区与噬菌体的融合体、或重链可变区与酶的融合蛋白，利用抗体的轻链可变区和重链可变区同时作用盐酸克伦特罗形成稳定复合体的原理，对盐酸克伦特罗进行检测；其中可以与抗体轻链可变区融合蛋白包括牛血清蛋白、血蓝蛋白，可与重链可变区融合的酶包括辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。其中抗体轻链可变区与相应的蛋白融合的过程采用现有的基因工程技术，将两者的基因链接为一个开放阅读框，然后通过大肠杆菌来制备轻链可变区与牛血清蛋白或血蓝蛋白的融合蛋白；另外可也直接表达抗体的轻链然后纯化来调制抗体的轻链可变区。

[0044] 抗体重链可变区与噬菌体pIII蛋白的融合体即呈递了抗体重链可变区的噬菌体。

[0045] 以下结合具体实施例来对本发明作进一步的描述。

[0046] 实施例

[0047] 1、抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白表达载体的构建

[0048] 首先，通过执行聚合酶链式反应(PCR)扩增抗体A2轻链的可变区，PCR反应以A2抗体基因为模板，反应引物为抗体轻链特异引物，引物两端分别附加了SalI和NotI限制酶切点，PCR使用的是东洋纺的KOD-Plus-聚合酶，反应条件是94℃30秒，55℃30秒，68℃1分钟，循环30次，反应结束后执行琼脂糖电泳，确认抗体轻链可变区基因的大小，使用限制酶分别处理扩增的抗体轻链和蛋白表达载体pMAL并纯化，使用T4 DNA连接酶将两者连接，转化大肠杆菌XL10-Gold，培养8~12小时，执行菌簇PCR，筛选阳性克隆，培养后抽取质粒，并对插入载体的基因进行测序确认。

[0049] 抗体轻链特异引物：

[0050] 正向引物：5'-TTCGCGTCGACGGAAATGTGCTCACCCA-3'；

[0051] 反向引物:5'-TGTGCGGCCGCACGTTTTATTTCCTAA-3'。

[0052] 如图1利用PCR扩增抗体轻链可变区基因的琼脂糖电泳图,M为DNA marker,V_L为PCR产物,在约380bp处观察到明显的条带,为抗体轻链可变区基因。

[0053] 如图2构建的表达抗体轻链可变区载体的结构图,该载体可以表达麦芽糖结合蛋白(Maltose Binding Protein,MBP)与抗体轻链可变区的融合蛋白,经过测序确认,插入的抗体轻链可变区序列无误。

[0054] 轻链可变区的氨基酸序列为:

[0055] ENVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSNTPKLIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNS YSLTISSMEAEDVATYYCFQSGSGYPFTFGSGTKLEIKR

[0056] 抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白的基因序列为:

[0057] ATGAAAATAAAACAGGTGCACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAACGACGATGATGTTTTCCGCCTC GGCTCTCGCCAAAATCGAAGAAGGTAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAA GTCGGTAAGAAATTCGAGAAAAGATACCGAATTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTCC CACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATC TGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGT TACAACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTATAACAAAGATCTGCTGCCGA ACCCGCCAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTT CAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGC AAGTACGACATTAAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAAGCGGGTCTGACCTTCTGGTTGACCTGATTA AAAACAAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGAC CATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAACGGTACTGCCGACCTTC AAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGG CAAAAGAGTTCTCGAAAACCTATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGC CGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACCATGGAAAACGCCAGAAA GGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCA GCGGTGCTCAGACTGTCGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAATAACAA TAACAACAACCTCGGGATCGAGGGAAGGATTTCAGAATTCGCGTCGACGGAATGTGCTACCCAGTCTCCAGCA ATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGT ACCAGCAGAAGTCAAACACCTCCCCAACTCTGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTCTG CTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACTCTTACTCTCTCACGATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTAT TACTGTTTTTCAGGGGAGTGGGTACCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGTGCGGCCGCAC ATCATCATCACCATCACGGGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCA;

[0058] 抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白的氨基酸序列为:

[0059] MKIKTGARILALSALTMMFSASALAKIEEGKLIWINGDKGYNGLAIEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDK LEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYN KDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVNAGAKAGLTF LVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAAS PNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYYEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTA VINAASGRQTVDEALKDAQTNSSNNNNNNNNNLGIEGRISEFASTENVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSV

SYMHWYQQKSNTSPKLWIYDTSKLGSGVPGRFSGSGSGNSYSLTISIMEAEDVATYYCFQSGSGYPFTFGSGTKLEIKRAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNAA;

[0060] 2、麦芽糖结合蛋白与抗体轻链可变区融合蛋白的表达与纯化

[0061] 将构建的抗体轻链可变区与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白表达载体转入大肠杆菌 BL21 (DE3), 铺板过夜培养, 挑取单克隆接种到 4mL LB 液体培养基内, 37℃ 预培养过夜, 次日取 2mL 的培养液接种到 200mL 的含有抗生素氨苄青霉素的 LB 培养基中进行培养, 当 600nm 的吸光度到 0.5 左右时, 加入终浓度为 1mM 的蛋白表达诱导物质异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导, 并在 28℃ 继续培养细菌 16 小时, 离心并收集培养上清液, 用 75% 的硫酸铵溶液沉淀蛋白后, 用 TALON 缓冲液溶解, 利用 TALON 树脂对表达的融合蛋白进行纯化, 纯化结束后执行电泳, 分析纯化蛋白的纯度。

[0062] 如图 3 纯化前后蛋白质的电泳结果图, M 是标准蛋白质, 1 为表达诱导前的蛋白质, 2 和 3 均为表达诱导后尚未纯化前的总蛋白质, 4 为纯化后的蛋白质, 从图 3 中可以看出, 融合蛋白得以高效表达及高纯度纯化。

[0063] 3、抗体重链可变区与噬菌体 pIII 蛋白的融合体的构建

[0064] 首先通过执行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增抗体 A2 重链可变区基因, PCR 反应以 A2 抗体基因为模板, 反应引物为抗体重链特异引物, 在引物两端分别附加了 NcoI 和 XhoI 限制酶切点, PCR 使用的是东洋纺的 KOD-Plus-聚合酶, 反应条件为 94℃ 30 秒, 55℃ 30 秒, 68℃ 1 分钟, 循环 30 次, 反应结束后执行琼脂糖电泳, 确认抗体重链可变区基因的大小, 使用限制酶分别处理扩增的抗体重链和噬菌体展示载体 pDong10S 并纯化, 使用 T4 DNA 连接酶将两者连接, 转化大肠杆菌 TG-1, 培养 8~12 小时, 执行菌簇 PCR, 筛选阳性克隆, 培养后抽取质粒, 并对插入载体的基因进行测序确认;

[0065] 挑单克隆阳性菌落至 4mL 含有 100μg/mL 氨苄青霉素的 2YT 培养基, 37℃ 过夜培养, 取 1mL 过夜培养菌液至 100mL 的含有同样抗生素的 2YT 培养液, 37℃ 培养大肠杆菌至 OD₆₀₀ 约为 0.4 时, 加入辅助噬菌体, 37℃ 下孵育 30 分钟, 离心去除上清, 加入 100mL 新鲜的含有氨苄青霉素 (100μg/mL) 及卡那霉素 (50μg/mL) 的 2YT 培养基, 悬浮大肠杆菌细胞, 30℃ 过夜培养。次日, 离心培养液分离培养上清和大肠杆菌细胞, 取 80mL 的上清至一个新的容器, 加入 20mL 的 PEG/NaCl 溶液, 冰上放置 30 分钟后, 离心, 弃上清, 用 2mL 的 PBS 溶液将沉淀溶解, 作为呈示了抗体重链可变区的噬菌体;

[0066] 培养含有 pDong10S-V_H (A2) 质粒的大肠杆菌, 并利用该大肠杆菌制作展示抗体重链可变区的噬菌体用于检测盐酸克伦特罗。

[0067] 抗体重链特异引物:

[0068] 正向引物: 5' -GCCGCCATGGCCGAGGTGAACCTGGTGGAA-3' ;

[0069] 反向引物: 5' -TGAGCTCGAGACTGTGAGAGTGGT-3' ;

[0070] 图 4 为利用 PCR 扩增抗体重链可变区基因的琼脂糖电泳图, M 为 DNA marker, V_H 为 PCR 产物, 在约 400bp 处观察到明显的条带, 即为抗体重链可变区基因。

[0071] 图 5 为构建的展示抗体重链可变区载体的结构图, 该载体可将抗体重链可变区呈示到噬菌体的表面。通过测序确认, 插入的抗体重链可变区基因序列无误。

[0072] 图 6 为呈示了抗体重链可变区的噬菌体示意图, 在噬菌体组装过程中, 噬菌体将连有抗体重链可变区的 pIII 蛋白误认为正常的 pIII 蛋白, 组装到噬菌体内, 从而将抗体重链

可变区呈示到噬菌体的表面。

[0073] 重链可变区的氨基酸序列为：

[0074] EVNLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTFYPDSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMSSLRSED TAMYYCASDDYKDYFDYWGQGTTLTV；

[0075] 抗体重链可变区与噬菌体pIII蛋白的融合体的基因序列为：

[0076] ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGCCATGGCCGA
GGTGAACCTGGTGGAATCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA
TTCACCTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCCGAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATT
GTAGTGGTGGTAGTTACACCTTCTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAA
CACCTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGCGATGATTACAAG
GACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCGAGCTCACC GGCGTCGGCCGCACATCATCATC
ACCATCACGGGGCCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTTGAAAGTTG
TTTAGCAAAACCTCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTTTAGATCGTTACGCTAAC
TATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTGGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTTACGGTACATGGG
TTCCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGA
GGGTGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGC
ACTTATCCGCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTT
TCATGTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGTGCATTAAGTGTATACGGGCACTGTTACTCAAGGCAC
TGACCCCGTTAAAACTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAA
TTCAGAGACTGCGCTTTCATTCTGGCTTAAATGAGGATCCATTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACC
TGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGCTCTGA
GGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGCTCCGGTCCGGTGATTTTGATTAT
GAAAAAATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAG
GCAAACTTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGTCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAA
TGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCT
TTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCTTTGCCTCAGTCGGTTGAATGTCGCCCTTATGTCTTTGGCGCTG
GTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGT
TGCCACCTTTATGTATGATTTTTCGACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCT；

[0077] 抗体重链可变区与噬菌体pIII蛋白的融合体的蛋白质序列为：

[0078] MYTIRSYFKKTVIMKYLLPTAAAGLLLLAAQPMAAEVNLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYA
MSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTFYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSED TAMYYCASDDYKDYFDYWG
QGTTLTVSSSPASAHHHHHHGAEEQLISEEDLNAAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNA
TGVVVCTGDETQCYGTWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQ
NPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQALTVYTGTVTQGTDPVKTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHS
GFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPVNAGGSGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGDFDYEKMANANK
GAMTENADENALQSDAKGKLDSVATDYGAIDGFIGDVSLANGNGATGDFAGSNSQMAQVGDGDN SPLMNNFRQY
LPSLPQSVECRPYVFGAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFMVVFSTFANILRNKES。

[0079] 4、检测盐酸克伦特罗浓度

[0080] 检测原理如图7所示，A2抗体的重链可变区和轻链可变区之间的相互作用受盐酸

克伦特罗的影响,在没有盐酸克伦特罗存在时,重链可变区和轻链可变区是分开的,当盐酸克伦特罗存在时,两个可变区与盐酸克伦特罗结合,溶液中盐酸克伦特罗的量越多,则会有更多的重链可变区与轻链可变区结合,如果将麦芽糖结合蛋白与抗体轻链可变区融合蛋白固定到酶标板上,之后加入噬菌体展示抗体重链可变区和盐酸克伦特罗,盐酸克伦特罗的浓度越高,则通过盐酸克伦特罗固定到酶标板的噬菌体就越多,此时加入酶标记的抗噬菌体抗体(抗M13单克隆抗体),则结合到的噬菌体的酶越多,加入酶的底物显色,则颜色越深,即盐酸克伦特罗的浓度与溶液的吸光度之间存在曲线关系,因此可以绘制盐酸克伦特罗浓度与吸光度的标准曲线,利用标准曲线测定溶液中盐酸克伦特罗的含量。

[0081] 在96孔酶标板的孔内加入100 μ L,5 μ g/mL麦芽糖结合蛋白与抗体轻链可变区融合蛋白,在3~5 $^{\circ}$ C下静置,8~12小时后去掉孔内的液体,加入200 μ L 2%脱脂奶粉溶液,20~30 $^{\circ}$ C下放置两个小时,对酶标板进行封闭;洗板后而微孔内加入100 μ L含有显示了抗体重链可变区的噬菌体及各种浓度盐酸克伦特罗(0,0.1,1,10,100,1000,10000ng/mL)溶液,在25 $^{\circ}$ C孵育1小时,去除孔内溶液,用含有0.1%吐温的PBS溶液(PBST溶液)洗涤酶标板,加入标记了辣根过氧化物酶(HRP)的抗噬菌体抗体溶液(抗M13单克隆抗体)(1 μ g/mL),25 $^{\circ}$ C孵育1小时,去除孔内溶液,用PBST洗板,最后加入HRP底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(TMBZ)溶液显色,测定孔内溶液在450nm可见光的吸收度,制作标准曲线,如图8所示。

[0082] 辣根过氧化物酶(HRP)可以用碱性磷酸酯酶替换,届时对应的酶底物为4-硝基苯磷酸二钠盐,测定吸光度时的可见光波长为405nm,形成的是黄色水溶性反应产物。

[0083] 图8中的横轴表示盐酸克伦特罗或阴性参照牛血清蛋白(BSA)的浓度,浓度从0到10000ng/mL,纵轴是每个浓度对应酶标孔内溶液的吸光度。当溶液中盐酸克伦特罗的浓度逐渐增加时,溶液的吸光度也在逐渐增加,呈函数对应关系,而作为阴性参照的BSA浓度的增加则不会使溶液的吸光度增加,因此可以根据该曲线来测定样品溶液中所含盐酸克伦特罗的含量。

序列表

<110> 山东宽和正生物医药有限公司

<120> 一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法

<130> 20181226A-1

<141> 2018-12-26

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 1

```

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Lys Leu 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 Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val
          50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser 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 Ser Asp Asp Tyr Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110
Thr Leu Thr Val
          115

```

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 2

```

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
          20           25           30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Asn Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

```

35	40	45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu		
65	70	75
Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr		
85	90	95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
100	105	
<210> 3		
<211> 1656		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<400> 3		
Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Cys Ala Gly		
1	5	10
Gly Thr Gly Cys Ala Cys Gly Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Gly Cys		
20	25	30
Ala Thr Thr Ala Thr Cys Cys Gly Cys Ala Thr Thr Ala Ala Cys Gly		
35	40	45
Ala Cys Gly Ala Thr Gly Ala Thr Gly Thr Thr Thr Thr Cys Cys Gly		
50	55	60
Cys Cys Thr Cys Gly Gly Cys Thr Cys Thr Cys Gly Cys Cys Ala Ala		
65	70	75
Ala Ala Thr Cys Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ala Ala		
85	90	95
Cys Thr Gly Gly Thr Ala Ala Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr Ala		
100	105	110
Ala Cys Gly Gly Cys Gly Ala Thr Ala Ala Ala Gly Gly Cys Thr Ala		
115	120	125
Thr Ala Ala Cys Gly Gly Thr Cys Thr Cys Gly Cys Thr Gly Ala Ala		
130	135	140
Gly Thr Cys Gly Gly Thr Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Thr Cys Gly		
145	150	155
Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Thr Ala Cys Cys Gly Gly Ala Ala Thr		
165	170	175
Thr Ala Ala Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Thr Gly Ala Gly		
180	185	190
Cys Ala Thr Cys Cys Gly Gly Ala Thr Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly		

195	200	205
Ala Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ala Thr Thr Cys Cys Cys Ala Cys Ala		
210	215	220
Gly Gly Thr Thr Gly Cys Gly Gly Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Cys		
225	230	235
Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Thr Ala		240
245	250	255
Thr Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Ala Cys Ala Cys Gly Ala		
260	265	270
Cys Cys Gly Cys Thr Thr Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Thr Ala Cys		
275	280	285
Gly Cys Thr Cys Ala Ala Thr Cys Thr Gly Gly Cys Cys Thr Gly Thr		
290	295	300
Thr Gly Gly Cys Thr Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Cys Cys Cys Cys		
305	310	315
Gly Gly Ala Cys Ala Ala Ala Gly Cys Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly		
325	330	335
Gly Ala Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala Thr Cys Cys Gly Thr		
340	345	350
Thr Thr Ala Cys Cys Thr Gly Gly Gly Ala Thr Gly Cys Cys Gly Thr		
355	360	365
Ala Cys Gly Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly		
370	375	380
Cys Thr Gly Ala Thr Thr Gly Cys Thr Thr Ala Cys Cys Cys Gly Ala		
385	390	395
Thr Cys Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Ala Ala Gly Cys Gly Thr Thr		
405	410	415
Ala Thr Cys Gly Cys Thr Gly Ala Thr Thr Thr Ala Thr Ala Ala Cys		
420	425	430
Ala Ala Ala Gly Ala Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Gly Ala		
435	440	445
Ala Cys Cys Cys Gly Cys Cys Ala Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly		
450	455	460
Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Cys Gly Gly Cys Gly		
465	470	475
Cys Thr Gly Gly Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Cys Thr Gly Ala		
485	490	495
Ala Ala Gly Cys Gly Ala Ala Ala Gly Gly Thr Ala Ala Gly Ala Gly		
500	505	510

Cys Gly Cys Gly Cys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Thr Cys Ala Ala Cys		
515	520	525
Cys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys Gly Thr Ala Cys Thr		
530	535	540
Thr Cys Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Gly Cys Thr Gly Ala Thr		
545	550	555
Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Thr		
565	570	575
Thr Ala Thr Gly Cys Gly Thr Thr Cys Ala Ala Gly Thr Ala Thr Gly		
580	585	590
Ala Ala Ala Ala Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly Thr Ala Cys Gly Ala		
595	600	605
Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Cys Gly Thr Gly Gly Gly Cys		
610	615	620
Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ala Ala Cys Gly Cys Thr Gly Gly Cys Gly		
625	630	635
Cys Gly Ala Ala Ala Gly Cys Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Ala Cys		
645	650	655
Cys Thr Thr Cys Cys Thr Gly Gly Thr Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly		
660	665	670
Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Cys Ala Ala Ala Cys Ala Cys Ala		
675	680	685
Thr Gly Ala Ala Thr Gly Cys Ala Gly Ala Cys Ala Cys Cys Gly Ala		
690	695	700
Thr Thr Ala Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Ala Gly Ala Ala		
705	710	715
Gly Cys Thr Gly Cys Cys Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly		
725	730	735
Gly Cys Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Cys Gly Ala Thr Gly Ala Cys		
740	745	750
Cys Ala Thr Cys Ala Ala Cys Gly Gly Cys Cys Cys Gly Thr Gly Gly		
755	760	765
Gly Cys Ala Thr Gly Gly Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Thr Cys Gly		
770	775	780
Ala Cys Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Ala Gly Thr Gly Ala Ala		
785	790	795
Thr Thr Ala Thr Gly Gly Thr Gly Thr Ala Ala Cys Gly Gly Thr Ala		
805	810	815
Cys Thr Gly Cys Cys Gly Ala Cys Cys Thr Thr Cys Ala Ala Gly Gly		

820						825						830							
Gly	Thr	Cys	Ala	Ala	Cys	Cys	Ala	Thr	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Cys	Cys				
835						840						845							
Gly	Thr	Thr	Cys	Gly	Thr	Thr	Gly	Gly	Cys	Gly	Thr	Gly	Cys	Thr	Gly				
850						855						860							
Ala	Gly	Cys	Gly	Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Ala	Cys	Gly				
865						870						875						880	
Cys	Cys	Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Thr	Cys	Cys	Gly	Ala	Ala	Cys	Ala	Ala				
885						890						895							
Ala	Gly	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly	Cys	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly				
900						905						910							
Thr	Thr	Cys	Cys	Thr	Cys	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Cys	Thr	Ala	Thr	Cys				
915						920						925							
Thr	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	Cys	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly				
930						935						940							
Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	Cys	Gly	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr				
945						950						955						960	
Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Cys	Ala	Ala	Ala	Cys	Cys	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly				
965						970						975							
Gly	Thr	Gly	Cys	Cys	Gly	Thr	Ala	Gly	Cys	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala				
980						985						990							
Gly	Thr	Cys	Thr	Thr	Ala	Cys	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly				
995						1000						1005							
Thr	Thr	Gly	Gly	Cys	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Cys	Cys	Ala	Cys				
1010						1015						1020							
Gly	Thr	Ala	Thr	Thr	Gly	Cys	Cys	Gly	Cys	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Thr				
1025						1030						1035						1040	
Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Cys	Gly	Cys	Cys	Cys	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala				
1045						1050						1055							
Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Thr	Cys	Ala	Thr	Gly	Cys	Cys	Gly	Ala				
1060						1065						1070							
Ala	Cys	Ala	Thr	Cys	Cys	Cys	Gly	Cys	Ala	Gly	Ala	Thr	Gly	Thr	Cys				
1075						1080						1085							
Cys	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Thr	Gly	Cys	Cys				
1090						1095						1100							
Gly	Thr	Gly	Cys	Gly	Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala				
1105						1110						1115						1120	
Thr	Cys	Ala	Ala	Cys	Gly	Cys	Cys	Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Gly	Gly				
1125						1130						1135							

Thr Cys Gly Thr Cys Ala Gly Ala Cys Thr Gly Thr Cys Gly Ala Thr			
1140	1145	1150	
Gly Ala Ala Gly Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala Gly Ala Cys Gly			
1155	1160	1165	
Cys Gly Cys Ala Gly Ala Cys Thr Ala Ala Thr Thr Cys Gly Ala Gly			
1170	1175	1180	
Cys Thr Cys Gly Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys			
1185	1190	1195	1200
Ala Ala Thr Ala Ala Cys Ala Ala Thr Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala			
1205	1210	1215	
Ala Cys Cys Thr Cys Gly Gly Gly Ala Thr Cys Gly Ala Gly Gly Gly			
1220	1225	1230	
Ala Ala Gly Gly Ala Thr Thr Thr Cys Ala Gly Ala Ala Thr Thr Cys			
1235	1240	1245	
Gly Cys Gly Thr Cys Gly Ala Cys Gly Gly Ala Ala Ala Ala Thr Gly			
1250	1255	1260	
Thr Gly Cys Thr Cys Ala Cys Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys			
1265	1270	1275	1280
Ala Gly Cys Ala Ala Thr Cys Ala Thr Gly Thr Cys Thr Gly Cys Ala			
1285	1290	1295	
Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly			
1300	1305	1310	
Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly			
1315	1320	1325	
Thr Gly Cys Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Gly Thr Gly Thr Ala			
1330	1335	1340	
Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Thr Gly Cys Ala Cys Thr Gly Gly Thr			
1345	1350	1355	1360
Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Thr Cys Ala Ala Ala			
1365	1370	1375	
Cys Ala Cys Cys Thr Cys Cys Cys Cys Cys Ala Ala Ala Cys Thr Cys			
1380	1385	1390	
Thr Gly Gly Ala Thr Thr Thr Ala Thr Gly Ala Cys Ala Cys Ala Thr			
1395	1400	1405	
Cys Cys Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly			
1410	1415	1420	
Ala Gly Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys Thr Thr Cys			
1425	1430	1435	1440
Ala Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly			

				1445					1450					1455			
Gly	Ala	Ala	Ala	Cys	Thr	Cys	Thr	Thr	Ala	Cys	Thr	Cys	Thr	Cys	Thr		
			1460						1465					1470			
Cys	Ala	Cys	Gly	Ala	Thr	Cys	Ala	Gly	Cys	Ala	Gly	Cys	Ala	Thr	Gly		
		1475						1480				1485					
Gly	Ala	Gly	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Gly	Thr	Thr	Gly		
	1490					1495				1500							
Cys	Cys	Ala	Cys	Thr	Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr		
1505				1510					1515					1520			
Thr	Cys	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Ala	Cys		
		1525				1530			1535								
Cys	Cys	Ala	Thr	Thr	Cys	Ala	Cys	Gly	Thr	Thr	Cys	Gly	Gly	Cys	Thr		
	1540					1545			1550								
Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala		
	1555					1560			1565								
Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Cys	Gly	Thr	Gly	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys		
	1570					1575			1580								
Gly	Cys	Ala	Cys	Ala	Thr	Cys	Ala	Thr	Cys	Ala	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys		
1585				1590					1595					1600			
Ala	Thr	Cys	Ala	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Cys	Gly	Cys	Ala	Gly	Ala		
	1605					1610			1615								
Ala	Cys	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Cys	Thr	Cys	Ala	Thr	Cys	Thr	Cys	Ala		
	1620					1625			1630								
Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly		
	1635					1640			1645								
Gly	Gly	Gly	Cys	Cys	Gly	Cys	Ala										
	1650					1655											
<210>	4																
<211>	1722																
<212>	PRT																
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																
<400>	4																
Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Cys	Cys	Thr	Ala	Thr	Thr	Gly	Cys		
1			5					10						15			
Cys	Thr	Ala	Cys	Gly	Gly	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly		
		20						25					30				
Ala	Thr	Thr	Gly	Thr	Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Cys	Thr	Cys	Gly	Cys	Gly		
	35							40					45				
Gly	Cys	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Ala	Thr	Gly	Gly		

50	55	60
Cys Cys Gly Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Thr		
65	70	75
Gly Gly Ala Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys		80
85	90	95
Thr Thr Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly		
100	105	110
Gly Gly Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr Cys Thr Cys		
115	120	125
Cys Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala		
130	135	140
Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Thr Ala Gly Cys Thr		
145	150	155
Ala Thr Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Cys Thr Thr Gly Gly Gly Thr		
165	170	175
Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Ala Cys Thr Cys Cys Gly Gly Ala Gly		
180	185	190
Ala Ala Gly Ala Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly		
195	200	205
Thr Cys Gly Cys Ala Ala Cys Cys Ala Thr Thr Ala Gly Thr Ala Gly		
210	215	220
Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Cys Cys		
225	230	235
Thr Thr Cys Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Thr Gly		
245	250	255
Thr Gly Ala Ala Gly Gly Gly Gly Cys Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys		
260	265	270
Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Thr		
275	280	285
Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly Thr		
290	295	300
Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Gly Cys Ala Gly		
305	310	315
Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys		
325	330	335
Ala Cys Gly Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr		
340	345	350
Gly Thr Gly Cys Ala Ala Gly Cys Gly Ala Thr Gly Ala Thr Thr Ala		
355	360	365

Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Thr Thr Gly Ala Cys			
370	375	380	
Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly Cys Ala			
385	390	395	400
Cys Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys			
405	410	415	
Gly Ala Gly Cys Thr Cys Ala Cys Cys Gly Gly Cys Gly Thr Cys Gly			
420	425	430	
Gly Cys Cys Gly Cys Ala Cys Ala Thr Cys Ala Thr Cys Ala Thr Cys			
435	440	445	
Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Gly Gly Gly Gly Cys Cys Gly Cys			
450	455	460	
Ala Gly Ala Ala Cys Ala Ala Ala Ala Ala Cys Thr Cys Ala Thr Cys			
465	470	475	480
Thr Cys Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Ala			
485	490	495	
Ala Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Gly Cys Ala Thr Ala Gly Ala Cys			
500	505	510	
Thr Gly Thr Thr Gly Ala Ala Ala Gly Thr Thr Gly Thr Thr Thr Ala			
515	520	525	
Gly Cys Ala Ala Ala Ala Cys Cys Thr Cys Ala Thr Ala Cys Ala Gly			
530	535	540	
Ala Ala Ala Ala Thr Thr Cys Ala Thr Thr Thr Ala Cys Thr Ala Ala			
545	550	555	560
Cys Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Cys Gly Ala Cys			
565	570	575	
Ala Ala Ala Ala Cys Thr Thr Thr Ala Gly Ala Thr Cys Gly Thr Thr			
580	585	590	
Ala Cys Gly Cys Thr Ala Ala Cys Thr Ala Thr Gly Ala Gly Gly Gly			
595	600	605	
Cys Thr Gly Thr Cys Thr Gly Thr Gly Gly Ala Ala Thr Gly Cys Thr			
610	615	620	
Ala Cys Ala Gly Gly Cys Gly Thr Thr Gly Thr Gly Gly Thr Thr Thr			
625	630	635	640
Gly Thr Ala Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Cys Gly Ala Ala Ala Cys			
645	650	655	
Thr Cys Ala Gly Thr Gly Thr Thr Ala Cys Gly Gly Thr Ala Cys Ala			
660	665	670	
Thr Gly Gly Gly Thr Thr Cys Cys Thr Ala Thr Thr Gly Gly Gly Cys			

675	680	685
Thr Thr Gly Cys Thr Ala Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala Ala		
690	695	700
Thr Gly Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Thr Cys Thr		
705	710	715
Gly Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Thr Cys Thr Gly		
725	730	735
Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Thr Cys Thr Gly Ala		
740	745	750
Gly Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Ala Cys Thr Ala Ala Ala		
755	760	765
Cys Cys Thr Cys Cys Thr Gly Ala Gly Thr Ala Cys Gly Gly Thr Gly		
770	775	780
Ala Thr Ala Cys Ala Cys Cys Thr Ala Thr Thr Cys Cys Gly Gly Gly		
785	790	795
Cys Thr Ala Thr Ala Cys Thr Thr Ala Thr Ala Thr Cys Ala Ala Cys		
805	810	815
Cys Cys Thr Cys Thr Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Ala Cys Thr Thr		
820	825	830
Ala Thr Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Thr Gly Ala		
835	840	845
Gly Cys Ala Ala Ala Ala Cys Cys Cys Cys Gly Cys Thr Ala Ala Thr		
850	855	860
Cys Cys Thr Ala Ala Thr Cys Cys Thr Thr Cys Thr Cys Thr Thr Gly		
865	870	875
Ala Gly Gly Ala Gly Thr Cys Thr Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr		
885	890	895
Thr Ala Ala Thr Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Thr Gly Thr Thr Thr		
900	905	910
Cys Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala Gly Gly Thr Thr Cys Cys		
915	920	925
Gly Ala Ala Ala Thr Ala Gly Gly Cys Ala Gly Gly Gly Thr Gly Cys		
930	935	940
Ala Thr Thr Ala Ala Cys Thr Gly Thr Thr Thr Ala Thr Ala Cys Gly		
945	950	955
Gly Gly Cys Ala Cys Thr Gly Thr Thr Ala Cys Thr Cys Ala Ala Gly		
965	970	975
Gly Cys Ala Cys Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Gly Thr Thr Ala Ala		
980	985	990

Ala Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly Thr Ala Cys		
995	1000	1005
Ala Cys Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Thr Cys Ala Thr Cys Ala Ala		
1010	1015	1020
Ala Ala Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Gly Ala Cys Gly Cys		
1025	1030	1035
1040		
Thr Thr Ala Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Gly Gly Thr Ala Ala Ala		
1045	1050	1055
Thr Thr Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Thr Gly Cys Gly Cys Thr Thr		
1060	1065	1070
Thr Cys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Gly Gly Cys Thr Thr Thr Ala Ala		
1075	1080	1085
Thr Gly Ala Gly Gly Ala Thr Cys Cys Ala Thr Thr Cys Gly Thr Thr		
1090	1095	1100
Thr Gly Thr Gly Ala Ala Thr Ala Thr Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys		
1105	1110	1115
1120		
Ala Ala Thr Cys Gly Thr Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Cys		
1125	1130	1135
Thr Cys Ala Ala Cys Cys Thr Cys Cys Thr Gly Thr Cys Ala Ala Thr		
1140	1145	1150
Gly Cys Thr Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly		
1155	1160	1165
Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly		
1170	1175	1180
Cys Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Cys		
1185	1190	1195
1200		
Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly		
1205	1210	1215
Gly Thr Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly		
1220	1225	1230
Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr		
1235	1240	1245
Thr Cys Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys Gly		
1250	1255	1260
Gly Thr Thr Cys Cys Gly Gly Thr Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Ala		
1265	1270	1275
1280		
Thr Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gly Gly Cys Ala		
1285	1290	1295
Ala Ala Cys Gly Cys Thr Ala Ala Thr Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly		

1300	1305	1310
Cys Thr Ala Thr Gly Ala Cys	Cys Gly Ala Ala Ala	Ala Thr Gly Cys
1315	1320	1325
Cys Gly Ala Thr Gly Ala Ala	Ala Cys Gly Cys Gly	Cys Thr Ala
1330	1335	1340
Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly	Ala Cys Gly Cys Thr	Ala Ala Gly
1345	1350	1355
Gly Cys Ala Ala Ala Cys Thr	Thr Gly Ala Thr Thr	Cys Thr Gly Thr
1365	1370	1375
Cys Gly Cys Thr Ala Cys Thr	Gly Ala Thr Thr	Ala Cys Gly Gly Thr
1380	1385	1390
Gly Cys Thr Gly Cys Thr Ala	Thr Cys Gly Ala Thr	Gly Gly Thr Thr
1395	1400	1405
Thr Cys Ala Thr Thr Gly Gly	Thr Gly Ala Cys Gly	Thr Thr Thr Cys
1410	1415	1420
Cys Gly Gly Cys Cys Thr Thr	Gly Cys Thr Ala Ala	Thr Gly Gly Thr
1425	1430	1435
Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly	Cys Thr Ala Cys Thr	Gly Gly Thr Gly
1445	1450	1455
Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys	Thr Gly Gly Cys Thr	Cys Thr Ala Ala
1460	1465	1470
Thr Thr Cys Cys Cys Ala Ala	Ala Thr Gly Gly	Cys Thr Cys Ala Ala
1475	1480	1485
Gly Thr Cys Gly Gly Thr Gly	Ala Cys Gly Gly	Thr Gly Ala Thr Ala
1490	1495	1500
Ala Thr Thr Cys Ala Cys Cys	Thr Thr Thr Ala Ala	Thr Gly Ala Ala
1505	1510	1515
Thr Ala Ala Thr Thr Thr Cys	Cys Gly Thr Cys Ala Ala	Thr Ala Thr
1525	1530	1535
Thr Thr Ala Cys Cys Thr Thr	Cys Thr Thr Thr	Gly Cys Cys Thr Cys
1540	1545	1550
Ala Gly Thr Cys Gly Gly Thr	Thr Gly Ala Ala	Thr Gly Thr Cys Gly
1555	1560	1565
Cys Cys Cys Thr Thr Ala Thr	Gly Thr Cys Thr Thr	Thr Gly Gly Cys
1570	1575	1580
Gly Cys Thr Gly Gly Thr Ala	Ala Ala Cys Cys	Ala Thr Ala Thr Gly
1585	1590	1595
Ala Ala Thr Thr Thr Thr Cys	Thr Ala Thr Thr	Gly Ala Thr Thr Gly
1605	1610	1615

Thr Gly Ala Cys Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala Cys Thr Thr Ala		
1620	1625	1630
Thr Thr Cys Cys Gly Thr Gly Gly Thr Gly Thr Cys Thr Thr Thr Gly		
1635	1640	1645
Cys Gly Thr Thr Thr Cys Thr Thr Thr Thr Ala Thr Ala Thr Gly Thr		
1650	1655	1660
Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Thr Thr Thr Thr Ala Thr Gly Thr Ala Thr		
1665	1670	1675
Gly Thr Ala Thr Thr Thr Thr Cys Gly Ala Cys Gly Thr Thr Thr Gly		
1685	1690	1695
Cys Thr Ala Ala Cys Ala Thr Ala Cys Thr Gly Cys Gly Thr Ala Ala		
1700	1705	1710
Thr Ala Ala Gly Gly Ala Gly Thr Cys Thr		
1715	1720	
<210> 5		
<211> 552		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<400> 5		
Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr		
1	5	10
Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala Lys Ile Glu Glu Gly Lys		
20	25	30
Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu		
35	40	45
Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu		
50	55	60
His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly		
65	70	75
Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr		
85	90	95
Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln		
100	105	110
Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys		
115	120	125
Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn		
130	135	140
Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala		
145	150	155
		160

Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn		
165	170	175
Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly		
180	185	190
Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly		
195	200	205
Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu		
210	215	220
Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu		
225	230	235
Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp		
245	250	255
Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val		
260	265	270
Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu		
275	280	285
Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu		
290	295	300
Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn		
305	310	315
Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu		
325	330	335
Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys		
340	345	350
Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala		
355	360	365
Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp		
370	375	380
Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn		
385	390	395
Asn Asn Asn Asn Asn Asn Leu Gly Ile Glu Gly Arg Ile Ser Glu Phe		
405	410	415
Ala Ser Thr Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala		
420	425	430
Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val		
435	440	445
Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Asn Thr Ser Pro Lys Leu		
450	455	460
Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe		

465	470	475	480
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met			
	485	490	495
Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr			
	500	505	510
Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala			
	515	520	525
Ala His His His His His His Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser			
	530	535	540
Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala			
545	550		
<210> 6			
<211> 586			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
<400> 6			
Met Tyr Thr Ile Arg Ser Tyr Phe Lys Lys Thr Val Ile Met Lys Tyr			
1	5	10	15
Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro			
	20	25	30
Ala Met Ala Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys			
	35	40	45
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe			
	50	55	60
Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu			
65	70	75	80
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Phe Tyr Pro			
	85	90	95
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn			
	100	105	110
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met			
	115	120	125
Tyr Tyr Cys Ala Ser Asp Asp Tyr Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly			
	130	135	140
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ser Pro Ala Ser Ala His His			
145	150	155	160
His His His His Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp			
	165	170	175
Leu Asn Gly Ala Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His			

	180					185					190				
Thr	Glu	Asn	Ser	Phe	Thr	Asn	Val	Trp	Lys	Asp	Asp	Lys	Thr	Leu	Asp
	195					200					205				
Arg	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Glu	Gly	Cys	Leu	Trp	Asn	Ala	Thr	Gly	Val	Val
	210					215					220				
Val	Cys	Thr	Gly	Asp	Glu	Thr	Gln	Cys	Tyr	Gly	Thr	Trp	Val	Pro	Ile
225					230					235					240
Gly	Leu	Ala	Ile	Pro	Glu	Asn	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly
	245					250					255				
Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Pro	Pro	Glu	Tyr
	260					265					270				
Gly	Asp	Thr	Pro	Ile	Pro	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Ile	Asn	Pro	Leu	Asp	Gly
	275					280					285				
Thr	Tyr	Pro	Pro	Gly	Thr	Glu	Gln	Asn	Pro	Ala	Asn	Pro	Asn	Pro	Ser
	290					295					300				
Leu	Glu	Glu	Ser	Gln	Pro	Leu	Asn	Thr	Phe	Met	Phe	Gln	Asn	Asn	Arg
305					310					315					320
Phe	Arg	Asn	Arg	Gln	Gly	Ala	Leu	Thr	Val	Tyr	Thr	Gly	Thr	Val	Thr
	325					330					335				
Gln	Gly	Thr	Asp	Pro	Val	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Tyr	Thr	Pro	Val	Ser
	340					345					350				
Ser	Lys	Ala	Met	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Trp	Asn	Gly	Lys	Phe	Arg	Asp	Cys
	355					360					365				
Ala	Phe	His	Ser	Gly	Phe	Asn	Glu	Asp	Pro	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Gln
	370					375					380				
Gly	Gln	Ser	Ser	Asp	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Val	Asn	Ala	Gly	Gly	Gly
385					390					395					400
Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Gly
	405					410					415				
Gly	Gly	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
	420					425					430				
Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Phe	Asp	Tyr	Glu	Lys	Met	Ala	Asn	Ala	Asn	Lys
	435					440					445				
Gly	Ala	Met	Thr	Glu	Asn	Ala	Asp	Glu	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Asp	Ala
	450					455					460				
Lys	Gly	Lys	Leu	Asp	Ser	Val	Ala	Thr	Asp	Tyr	Gly	Ala	Ala	Ile	Asp
465					470					475					480
Gly	Phe	Ile	Gly	Asp	Val	Ser	Gly	Leu	Ala	Asn	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr
	485					490					495				

Gly	Asp	Phe	Ala	Gly	Ser	Asn	Ser	Gln	Met	Ala	Gln	Val	Gly	Asp	Gly
500				505				510							
Asp	Asn	Ser	Pro	Leu	Met	Asn	Asn	Phe	Arg	Gln	Tyr	Leu	Pro	Ser	Leu
515				520				525							
Pro	Gln	Ser	Val	Glu	Cys	Arg	Pro	Tyr	Val	Phe	Gly	Ala	Gly	Lys	Pro
530				535				540							
Tyr	Glu	Phe	Ser	Ile	Asp	Cys	Asp	Lys	Ile	Asn	Leu	Phe	Arg	Gly	Val
545				550				555				560			
Phe	Ala	Phe	Leu	Leu	Tyr	Val	Ala	Thr	Phe	Met	Tyr	Val	Phe	Ser	Thr
565				570				575							
Phe	Ala	Asn	Ile	Leu	Arg	Asn	Lys	Glu	Ser						
580				585											

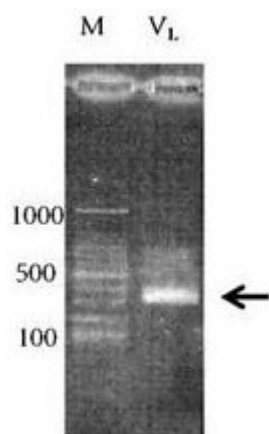


图1

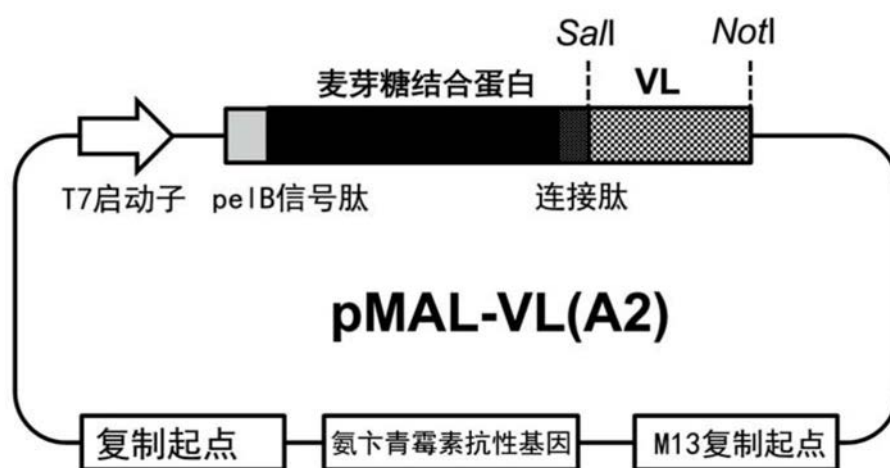


图2

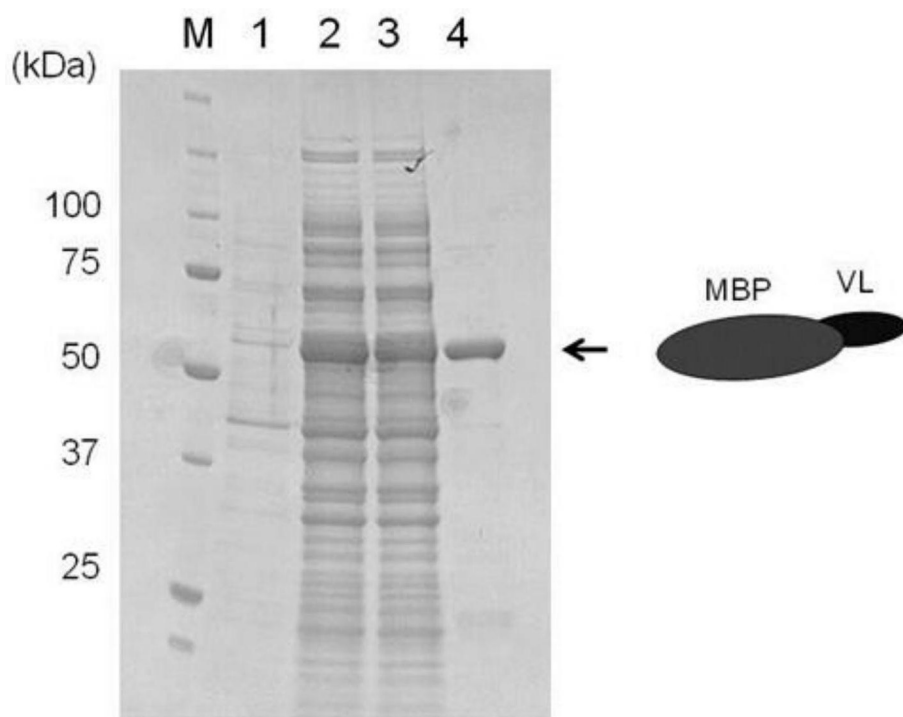


图3

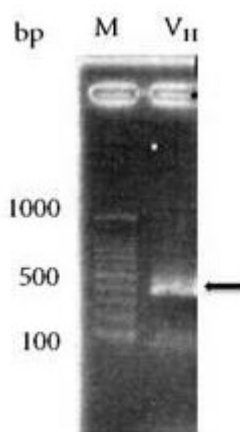


图4

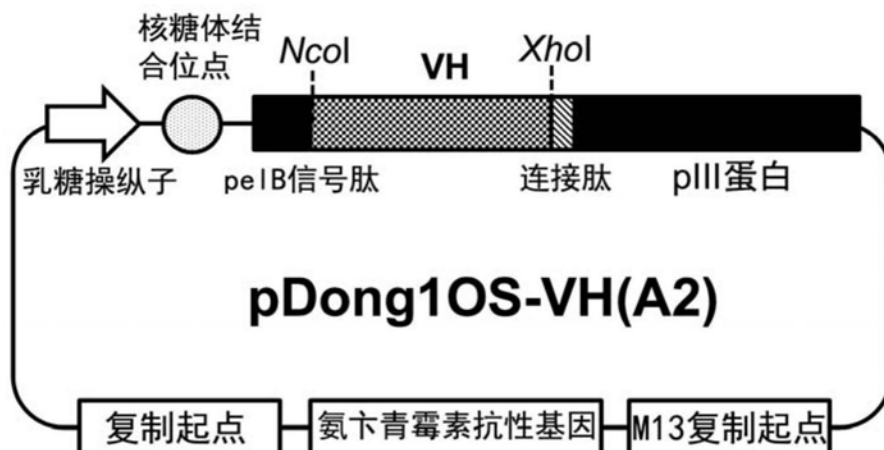


图5

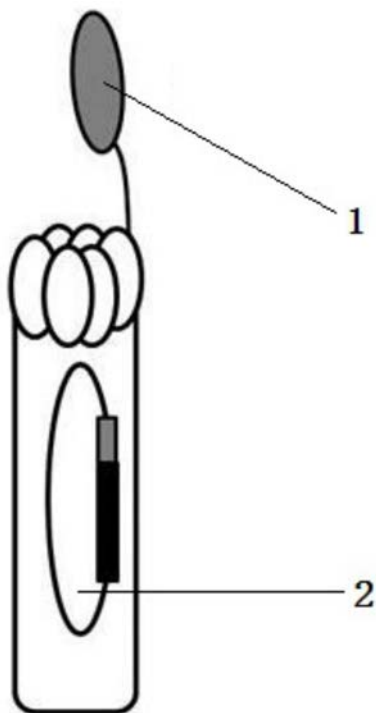


图6

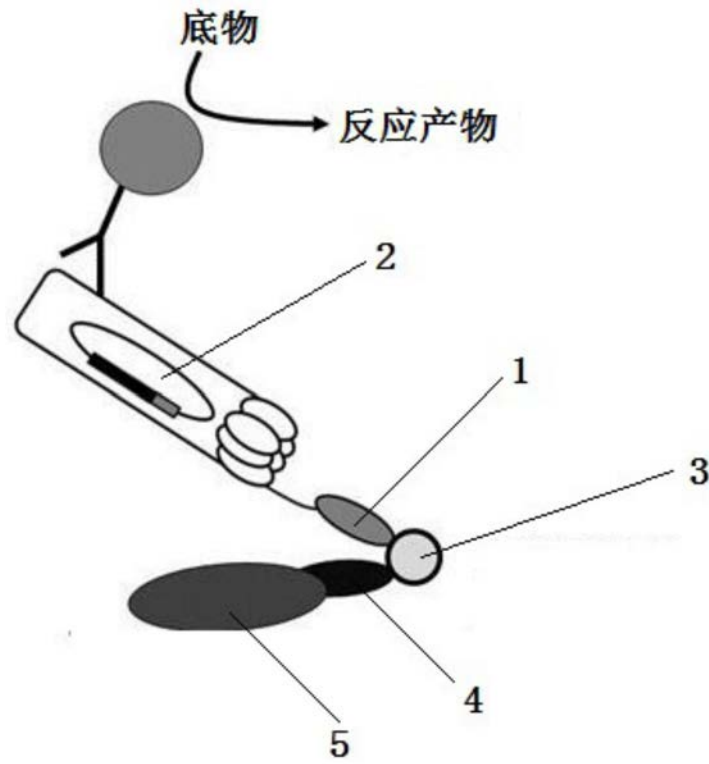


图7

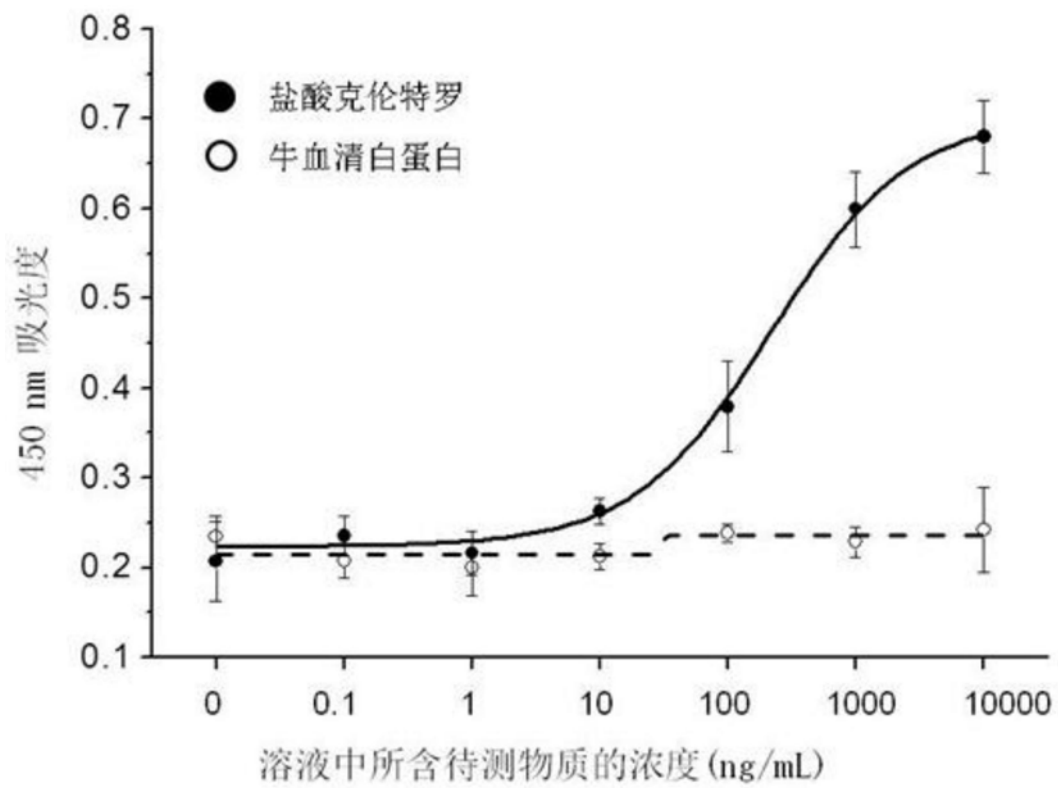


图8

专利名称(译)	一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法		
公开(公告)号	CN109738645A	公开(公告)日	2019-05-10
申请号	CN201811597037.1	申请日	2018-12-26
[标]发明人	董金华 董航 单喜军		
发明人	董金华 董航 单喜军		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 C07K19/00 C12N15/62 C12N15/70		
代理人(译)	张娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法，分别调制抗体的轻链可变区或轻链可变区与其他蛋白的融合蛋白质、重链可变区或重链可变区与噬菌体的融合体、或重链可变区与酶的融合蛋白，利用抗体的轻链可变区和重链可变区同时作用盐酸克伦特罗形成稳定复合体的原理，对盐酸克伦特罗进行检测；本发明检测盐酸克伦特罗含量的非竞争法酶联免疫分析方法，不需要在酶标板上包被盐酸克伦特罗与牛血清蛋白的偶联物或制备盐酸克伦特罗与酶的偶联物，大大降低了检测成本，具有检测速度快，灵敏度高，准确度高，易于实施，检测成本低等优点。

