



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103694354 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 02

(21) 申请号 201310749804. 7

(22) 申请日 2013. 12. 31

(71) 申请人 黑龙江八一农垦大学

地址 163319 黑龙江省大庆市高新区新风路
5号

(72) 发明人 王颖 张东杰 柳增善 姚笛
霍方珍

(74) 专利代理机构 北京爱普纳杰专利代理事务
所(特殊普通合伙) 11419

代理人 何自刚 王玉松

(51) Int. Cl.

C07K 16/44 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表5页 附图3页

(54) 发明名称

一种环丙沙星与克伦特罗双特异性融合抗体
及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种环丙沙星与克伦特罗双特
异性融合抗体及其应用,属于免疫快速筛检技术
领域。本发明通过将环丙沙星单链抗体和克伦特
罗单链抗体的V_H和V_L基因进行整合得到能同时与
上述2种残留药物发生反应的多特异性抗体。以
此多联特异性融合单链抗体为探针建立一种快速
的免疫学检测方法,从而达到一次性、快速、筛检
多种残留药物的目的。

1. 一种双特异性融合抗体,其特征在于,是将来源于小鼠的 2 种单链抗体的 V_H 和 V_L 基因进行整合得到;所述 2 种单链抗体分别是环丙沙星单链抗体和克隆特罗单链抗体。
2. 根据权利要求 1 所述的融合抗体,其特征在于,2 种单链抗体的 V_H 和 V_L 基因通过有别于组装单链抗体基因的连接肽连接。
3. 根据权利要求 1 所述的融合抗体,其特征在于,所述融合抗体包含 2 个结构域,第一结构域可与环丙沙星的表位结合,第二结构域可与克隆特罗的表位结合。
4. 编码权利要求 1 所述融合抗体的基因,其特征在于,核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。
5. 含有权利要求 4 所述基因的质粒或细胞。
6. 获得权利要求 1 所述融合抗体的方法,其特征在于,是化学合成序列如 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示的 2 条单链抗体基因,连接表达载体 pET-22b,分别构建 pET-22b-CPFX-ScFv 和 pET-22b-CL-ScFv;设计合成引物,通过 PCR 方法从制备的 2 个重组质粒中扩增获得 2 个单链抗体的 V_H 和 V_L 基因片段,再通过重叠 PCR 组装起来,所得目的基因纯化后连接到表达载体 pGEX-6P-1 上,得到重组质粒 pGEX-CPFX-CL,转化 DH5 α 感受态细胞,筛选测序正确的重组质粒 pGEX-CPFX-CL 转化 E. coli 感受态 BL21 (DE3),在 20°C 条件下诱导表达融合抗体。
7. 权利要求 1 所述融合抗体在残留药物检测中的应用。

一种环丙沙星与克伦特罗双特异性融合抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种环丙沙星与克伦特罗双特异性融合抗体及其应用,特别是一种能同时与 2 种残留药物发生免疫学反应的抗体,属于免疫快速筛检技术领域。

背景技术

[0002] 传统的单克隆抗体由于其分子本身 F_c 庞大结构特点,使得其在疾病诊断和治疗方面存在诸多弊端:首先传统单克隆抗体的异源性使得诱发免疫反应普遍较强;其次,在体内代谢快,特异性稍差;再次,杂交瘤技术筛选的单克隆抗体多数只能保持天然抗体的活性,且挑选的抗体无中和抗原生物活性的能力,要挑选中和性抗体是相当复杂和困难的。最后,许多特异性抗体在体内并不能够完全发挥其预期的凝集活性;许多优良的抗体杂交瘤细胞株在传代过程中稳定性不强,容易丢失。再附以制备工作过程繁琐拖沓和费时费力,使得单克隆抗体技术的普及一度受限。

[0003] 单链抗体,是在 DNA 水平上将抗体轻链和重链可变区基因用一段适当的寡核苷酸 (Linker) 连起来,使之在适当生物体中表达成为一条单一肽链,称为单链抗体 (SinglechainFv, ScFv)。作为一个重要基因工程抗体,ScFv 更易于在原核细胞进行表达和在基因水平进行改造。对 ScFv 的进一步研究中,在取得了重大进展的同时,一些应用于临床出现的问题也暴露出来,如亲和力较低,稳定性较差,半衰期短等缺点,这些缺点也限制着 ScFv 在治疗过程中的普及性。

[0004] 利用两种不同的单链抗体的 V_H 和 V_L 基因,使其在表达过程中实现重新组合,形成具有双特异性的单链抗体,这种双特异性单链抗体可以同时与两种抗原特异性地结合。与传统的双特异性抗体相比,双特异性单链抗体既保持了特异性结合抗原的特点,又具有以下优点:缺失 F_c 片段,减少了与 FcR 阳性细胞发生非特异性结合的可能性;最大限度地降低了鼠源性蛋白,降低了免疫变态反应的可能性;分子量小,有利于穿透肿瘤组织;避免了传统制备双特异性抗体需要进行细胞杂交的步骤,减少了工作量,提高了制备的成功率。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种环丙沙星与克伦特罗双特异性融合抗体及其应用,是将来源于小鼠的 2 种单链抗体的 V_H 和 V_L 基因进行整合得到,含有 4 个抗体重链与 4 个抗体轻链。

[0006] 所述 2 种单链抗体分别是环丙沙星单链抗体和克伦特罗单链抗体,编码相应抗体的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示。

[0007] 所述多特异性抗体,包含(a)环丙沙星单链抗体的 V_H 和 V_L 基因片段;(b)克伦特罗单链抗体的单链抗体片段;所述片段(a)、(b)通过有别于组装单链抗体基因的连接肽连接。

[0008] 所述融合抗体包含 2 个结构域,第一结构域可与环丙沙星的表位结合,第二结构域可与克伦特罗的表位结合。

[0009] 编码所述融合抗体的基因序列为 SEQ ID NO:1 所示。

[0010] 获得所述融合抗体的方法是采用自行设计的特异性简并引物, PCR 获取环丙沙星单链抗体和克伦特罗单链抗体的 V_H 和 V_L , 再通过重叠 PCR 将重链轻链片段分别组装成单链抗体, 利用柔性 linker 串联连接, 纯化后双酶切、回收、分别连接到表达载体 pGEX-6P-1, 得到重组质粒 pGEX-CPFX-CL, (构建方案如图 2 所示) 转化 DH5 α 感受态细胞, 测序验证后, 将重组质粒 pGEX-CPFX-CL 转化 DE3 在 20°C 条件下培养表达融合抗体。

[0011] 本发明所提供的多特异性融合抗体具有广谱特异、低耗高效和灵敏便捷地同步筛选多种残留兽药的优点。

附图说明

[0012] 图 1 为构建重组蛋白 pET-22b-CPFX - ScFv 的载体。

[0013] 图 2 为构建重组蛋白 pET-22b-CPFX-CL - ScFv 的载体。

[0014] 图 3 pET-22b-CPFX-ScFv 不同时间内的诱导表达 SDS-PAGE 分析;

[0015] (1, 0h ; 2, 1h ; 3, 2h ; 4, 3h ; 5, 4h ; 6, 5h ; 7, Marker ; 8, 空载体对照 ; 9, 空载体对照)。

[0016] 图 4 pET-22b-CL-ScFv 不同时间内的诱导表达 SDS-PAGE 分析;

[0017] (1, 2h ; 2, 3h ; 3, 4h ; 4, 5h ; 5, 对照 ; 6, Marker ; 7, 6h ; 8, 7h ; 9, 8h ; 10, 9h)。

[0018] 图 5 IPTG 诱导表达双特异性融合蛋白电泳图;

[0019] (1, 0h ; 2, 1h ; 3, 2h ; 4, 3h ; 5, 4h ; 6, 5h ; 7, 6h ; 8, 蛋白 Marker)。

具体实施方式

[0020] 实施例 1 环丙沙星和克伦特罗单链抗体的制备

[0021] 采用化学合成的方法分别获得环丙沙星和克伦特罗单链抗体。编码环丙沙星单链抗体、克伦特罗单链抗体的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3 所示。

[0022] 实施例 2 环丙沙星和克伦特罗单链抗体在 pET-22b(+) 原核载体中表达

[0023] 利用实施例 1 中的 2 个基因与 pET-22b 表达系统, 分别构建 pET-22b-CPFX-ScFv 和 pET-22b-CL-ScFv。以 pET-22b-CPFX - ScFv 的构建为例进行说明, 详见图 1, pET-22b-CL-ScFv 质粒的构建参见 pET-22b-CPFX - ScFv 的构建方法。

[0024] 目的基因产物与表达载体质粒的双酶切体系为如表 1。双酶切的目的片段纯化回收, 按表 2 体系连接, 瞬时离心混匀于管底。4°C 连接过夜, 备用。

[0025] 表 1 pET-22b-CPFX-ScFv 双酶切体系

[0026]

成分	体积 (μL)
10×K Buffer	5
1%BSA	5
<i>EcoRI</i>	2
<i>SalI</i>	2
质粒 DNA	20
ddH ₂ O	16
Total	50

[0027] 表 2pET-22b-CL-ScFv 双酶切体系

[0028]

成分	体积 (μL)
10×K Buffer	5
1%BSA	5
<i>SalI</i>	2
<i>NotI</i>	2
质粒 DNA	20
ddH ₂ O	16
Total	50

[0029] 表 3 两种单链抗体都双酶切连接体系

[0030]

成分	体积 (μL)
灭菌去离子水	4.5
表达载体	2
PCR 产物	1.5
10×T ₄ DNA 连接酶缓冲液	1
T ₄ DNA 连接酶 (3U/ μL)	1

[0031] 将上述重组质粒分别转化大肠杆菌 DE3, 将鉴定的阳性重组质粒重新接种于 Amp⁺/LB 的平板, 提取单个菌落后接种于 5mL Amp⁺/LB 液体培养基中, 37°C 振荡培养其 D₆₀₀ 值约达 0.6, 加入终浓度为 1mM 的 IPTG, 分别于 37°C 和 25°C 振荡诱导培养, 取不同诱导时间的菌液进行 SDS-PAGE 分析, 同时设空载体 pET-22b 转化的 DE3 诱导与未诱导菌液作对照。

[0032] SDS-PAGE 分析: 将培养好的菌液在 6000rpm 4°C 离心 16min, 弃上清, 用 pH7.4 的 PBS 悬起后 -20°C 冻存。冰水浴中超声破碎融化的离心菌体悬液, 裂解条件为: 超声 15s, 间歇 15s, 共 15min, 波幅 85%。待超声菌液稍浑浊时 4°C 12000rpm 离心 30min, 收集蛋白上

清液。配制 10% 分离胶和 5% 积层胶聚丙烯酰胺浓缩胶。对表达的全菌体蛋白上清液进行 SDS-PAGE 定位分析。为了寻找最佳的表达条件,我们研究了不同的诱导时间和不同浓度的诱导剂 IPTG 对工程菌表达的影响。

[0033] (1) pET-22b-CPFX-ScFv 融合蛋白表达及 SDS-PAGE 的鉴定,全菌体电泳分析见图 3。表达定位分析显示:在 IPTG 终浓度为 1mM 时表达量即可达到最高,上清表达量可达到 42%。另外,37°C 条件下目的蛋白以包涵体和可溶性两种形式表达,以包涵体表达为主,在 25°C 的目的蛋白全部以可溶性蛋白为主。试剂盒测定蛋白浓度为 1.73mg/mL。

[0034] (2) pET-22b-CL-ScFv 融合蛋白表达及 SDS-PAGE 鉴定。表达定位分析如图 4 显示:在 IPTG 终浓度为 1mM 时表达量最高,上清表达量可达到 27.6%。37°C 条件下目的蛋白仍以包涵体和可溶性两种形式表达,包涵体表达为主,在 25°C 目的蛋白基本均为可溶性蛋白。测定蛋白质浓度为 1.64mg/mL。

[0035] 实施例 3 融合抗体的构建

[0036] 设计并合成了 3 对扩增单链抗体可变区基因的引物(由上海 Sangon 合成),各引物的序列、在全基因组中的起始位置及添加的酶切位点见表 3。

[0037] 表 4 扩增各基因的引物

[0038]

基因	大小	引物序列	酶切位点
CPFX	726 bp	P1: 5' <u>GAATTC</u> CAGGTCC	ECOR I
		AGCTGCAGCAGTCT-3'	
		P2: 5' <u>AGAGCCACCGCCACC</u> CTTGG	
CL	741bp	TGCCCCGAACGTGTAT-3'	—
		P3: 5' <u>GGTGGCGGTGGCTCT</u> CAGGTC	
		AAACTGCAGGAGTCA-3'	
CPFX-CL	1467 bp	P4: 5' <u>GCGGCCGCTTACCGTTT</u>	Not I
		GATTCCAGCTT-3'	
		P5: 5' <u>GGATCCCAGGTCCAGCTGCA</u>	
		GCAGTCT-3'	

[0039] (“—”为加入的保护性碱基,下划线部分为引入的酶切位点,酶切位点分别为 ECOR I 和 Not I,斜体黑框为加入的连接肽,黑体为加入的终止密码)

[0040] 分析单链抗体系列基因序列特征,设计合成 2 对引物,每对引物引入有别于组装单链抗体基因的第二种连接肽,通过 PCR 方法从制备的 2 个重组菌中扩增获得两个单链抗体的融合基因片段,再通过柔性 linker 组装,将 2 个单链抗体片断连接起来,目的基因纯化后双酶切回收连接到表达载体 pGEX-6P-1 的相应位点,得到重组质粒 pGEX-CPFX-CL,转化 DH5 α 感受态细胞,经蓝白斑筛选,挑取白色的菌落接菌培养后小提质粒,酶切鉴定正确

的质粒送上海联合基因公司测序。测序正确的 pGEX-CPFX-CL 转化到 DE3, 1M IPTG 诱导表达双特异性融合蛋白 53ku (见图 5)。

[0041] 表 5 融合 ScFv 的 PCR 反应体系

[0042]

成分	体积 (μL)
10×PCR Buffer	2.5
dNTPs (2.5mM)	2
S(20μM)	1
X(20μM)	1

[0043]

单链抗体的质粒 (两个串联扩增时两种/次)	0.5 (串联扩增时各 0.5)
pfu DNA 聚合酶 (1U)	0.2
H ₂ O	.75
Total	25

[0044] 表 6 串联两种 ScFv 的不同 PCR 反应体系

[0045]

基因	扩增条件
CPFX	94℃ 预变性 4min: 94℃ 30s, 59℃ 40s, 72℃, 75s, 35cycles: 72℃ 延伸 10min
CL	94℃ 5min, 94℃ 1min, 62℃ 45s, 72℃, 45s, 25cycles: 72℃ 延伸 5min
CPFX-CL	94℃ 预变性 4min: 94℃ 30s, 59℃ 50s, 72℃, 150s, 35cycles: 72℃ 延伸 10min

[0046] 表 7 双酶切体系

[0047]

目的基因片段的双酶切体系		pGEX-6P-1 的双酶切体系	
成分	体积 (μL)	成分	体积 (μL)
10×K Buffer	1	10×K Buffer	1.5
1%BSA	1	1%BSA	1.5
<i>Not</i> I	1	<i>Not</i> I	2
<i>ECOR</i> I	1	<i>ECOR</i> I	2
PCR 回收产物	10	pGEX 空载体质粒	20
ddH ₂ O	6	ddH ₂ O	3
Total	20	Total	30

[0048] 实施例 4 融合蛋白 pGEX-CPFX-CL 的纯化

[0049] (1)将测序正确的重组质粒 pGEX-CPFX-CL 转化 *E. coli* 感受态 BL21 (DE3), 在 20℃ 条件下诱导 20h 后表达。

[0050] 应用 MicroSpin™ GST Purification Module Kit GST-CCS 纯化上清蛋白, 步骤如下:

[0051] 1) 轻轻悬浮 Glutathione Sepharose4B Microspin 柱子的胶。

[0052] 2) 将盖子打开 1/4 圈, 打开底部螺栓。

[0053] 3) 将 MicroSpin 柱子放入一个清洁的 1.5mL 离心管内, 在室温下以 3000rpm 离心 1min, 弃掉缓冲液。

[0054] 4) 加入 600 μL 含有融合蛋白的上清, 关闭底部螺栓。室温轻轻摇动 MicroSpin 纯化柱, 使融合蛋白与 Glutathione Sepharose4B 基质混合均匀。

[0055] 5) 打开 MicroSpin 纯化柱底部螺栓, 将其放入一个清洁的 1.5mL 离心管内, 在室温下以 3000rpm 离心 1min, 弃掉缓冲液。

[0056] 6) 将 MicroSpin 纯化柱装入 1.5mL 离心管内, 加入 250 μL -600 μL 的 1×PBS, 在室温下以 3000rpm 离心 1min, 弃掉缓冲液。洗涤 2 次。

[0057] 7) 加入 100-200 μL 的谷胱甘肽洗脱缓冲液(还原型谷胱甘肽), 在室温下孵育 5-10min。

[0058] 8) 打开底部螺栓, 将 MicroSpin 纯化柱装入 1.5mL 离心管内, 在室温下以 3000rpm 离心 1min, 收集洗脱的样品。

[0059] SDS-PAGE 检测洗脱样品, 考马斯亮蓝染色, 脱色后照相。

[0060] (2) 纯化的目的蛋白含量测定: Pierce BCA 蛋白定量试剂盒测定纯化的融合蛋白含量。pGEX-CPFX-CL 质粒转化 *E. coli* 感受态 BL21 (DE3) 中进行诱导表达。SDS-PAGE 电泳结果显示, 37℃ 时 IPTG 诱导表达, 重组质粒 pGEX-CPFX-CL 出现明显的表达带, 其大小与理论预测分子量 79ku 相符 (其中 GST-Tag 为 26ku), 且 1mM IPTG 诱导 4h 时表达量达到最高。pGEX-CPFX-CL 在 20℃ 条件下诱导 10h, 目的蛋白在上清中表达量增加, 但相对较低, 仅为 15.4%。

[0061] 实施例 5 融合蛋白的含量测定及反应原性

[0062] (1)应用 Pierce BCA 试剂盒测定蛋白含量,通过标准曲线计算出融合蛋白的浓度为 0.615mg/mL。

[0063] (2)梯度稀释纯化的融合蛋白 pGEX-CPFX-CL,间接 ELISA 检测反应原性,抗原通过重氮化法制备。如表 7、8 所示。通过实际样品的检测试验来鉴定融合多联单链抗体的敏感性、特异性和交叉性,最终以此多联特异性融合单链抗体为探针建立一种快速的免疫学检测方法,从而达到一次性、快速、筛检多种残留药物的目的。突出优势体现在:不仅正面的、充分的利用了单抗可能产生的广泛交叉谱进而筛检出多于两种的疑似残留药物,而且克服传统检验检疫中存在的设备昂贵、步骤繁琐、检测目标单一和费时耗力等缺点,轻松达到简便快捷灵敏高效的目的,更能详尽分析、比较不同类型抗体间的结合位点的特异性和功能域的差别。为最终利用一种融合抗体同时与相关的两种残留药物发生免疫学反应,所建立的方法也能同时筛检两种药物。

[0064] 表 8 间接 ELISA 初步鉴定 pGEX-CPFX-CL 表达产物免疫学活性(OD₄₉₀)

[0065]

检测抗原 μg/100μL	抗体稀释倍数*1000								
	1: 0.25	1: 0.5	1: 1	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	
CPFX	2.0	2.883	2.687	1.895	1.615	1.513	1.148	0.994	0.608
-OVA	1.0	1.769	1.437	0.806	0.613	0.604	<u>0.416</u>	0.414	0.284
	0.5	1.535	0.935	0.679	0.709	0.403	0.334	0.213	0.179
	1.00	2.577	1.917	1.586	1.413	1.048	0.904	2.487	0.483
CL	0.50	1.937	1.721	1.127	0.791	<u>0.452</u>	0.384	1.827	0.194
-OVA	0.25	1.513	0.627	0.881	0.559	0.391	0.334	0.313	0.215
阴性对照		0.168	0.167	0.171	0.1735	0.168	0.171	0.169	0.169
空白		0.059	0.057	0.051	0.061	0.057	0.058	0.060	0.061

[0066] 注:*为 OD 值高于 3.5(酶标仪检测范围),下划线表示最低的有效值。

[0067] 表 9 间接 ELISA 比较三种单抗、单链抗体及其融合表达产物的敏感性

[0068]

		三种药物检测抗原($\mu\text{g}/100\mu\text{L}$)					
抗体稀释倍数*1000		2	1	0.5	0.25	阴性对照	空白
CPFX-McAb		2.914	2.571	1.995	1.871	0.181	0.057
CPFX- ScFv		1.972	1.821	1.607	1.494	0.183	0.063
pGEX - CPFX-CL	1: 8	0.721	<u>0.428</u>	0.406	0.474	0.185	0.064
CL- McAb		2.917	2.725	1.971	1.947	0.181	0.059
CL- ScFv		1.448	1.476	0.851	0.586	0.179	0.061

[0069]

pGEX - CPFX-CL		0.657	0.601	<u>0.551</u>	0.445	0.182	0.069
-------------------	--	-------	-------	--------------	-------	-------	-------

[0070] 注:下划线表示最低的有效值。

[0071] 表 10 间接 ELISA 同步测定 pGEX-CPFX-CL 表达产物对两种兽药的免疫学活性 (OD_{490})

[0072]

检测抗原		抗体稀释倍数*1000							
$\mu\text{g}/100\mu\text{L}$		1: 0.25	1: 0.5	1: 1	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32
CPFX-OVA	1.0	1.719	1.417	0.876	0.693	0.613	<u>0.546</u>	0.334	0.194
CL-OVA	0.50	1.857	1.509	1.117	0.792	<u>0.521</u>	0.391	0.307	0.164
阴性对照		0.149	0.154	0.153	0.158	0.161	0.157	0.160	0.161
空白		0.045	0.047	0.048	0.051	0.057	0.049	0.055	0.052

[0073] 注:*为 OD 值高于 3.5(酶标仪检测范围),下划线表示最低的有效值。

[0074] 从表 10 可以看出,当不同种偶联的兽药抗原同时包被时(采用之前实验获得的最低、最佳作用效果验证),间接 ELISA 检测结果证明,pGEX - CPFX-CL 融合抗体的灵敏度没发生明显改变,说明该融合抗体能分别与每一抗原反应时无空间上的阻碍,而且可以同时与两种药物发生特异反应,作用效果良好。

[0001]

序列表

<110> 黑龙江八一农垦大学

<120> 一种环丙沙星与克伦特罗双特异性融合抗体及其应用

<130> 1

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1465

<212> DNA

<213> 融合基因

<400> 1

atggeccagg tgaagctgca gcagtctggg ggaggcttag tgaagtctgg agggtcctg 60

aaacctect gtgfagctc tggatfcaact ttcagtaact atgcatgctc ctgggttege 120

cagactcagg aaaagagget ggaatgggtc gcaagcatta ctcttggtgg tegttaacc 180

cagtctccag acagtgtgaa gggctgatte accatctcca gagacgatgg caagaacacc 240

ctgtacctcc aaatgagcag tctgaggctt gaggacaagg ccatatatta ctgtgcaaga 300

gataataggg ttaccatgag atactfegat geetggggcg cagggaccac ggtcaccgtc 360

tcctcaggag gtggcgggtc aggcggagge ggatctggcg gaggeggate tggcggtgge 420

[0002]

ggatcggaca tfgagctcac ccagtctccc gcaatcatgt ctgcattctc aggggaaaag	480
gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaaactact tgcgctggca ccagcagaag	540
tcatecaact cccccaaact ctggatttat gacacatecc aectggette tggagtecca	600
ggtegettca gtggcagtgg gtctggaaac tcttactctc tcacgacag cagcatggag	660
getgaagatg ttgccactta ttactgtttt caggggagtg ggtaeccata caegtccggg	720
gcaccaaget gaggtggcgg tggtctcag gtgcagctgc aggagtctgg gggaggetta	780
gtgaagtctg gagggtccct gaaaccctcc tgtgtagect ctggattcac ttccagtaec	840
tatgceatgt cctgggttcg ccagactccg gaaaagagge tggaaatgggt cgcaagcatt	900
actcttggtg gtcttfaeac ccagtctcca gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc	960
agagaecatg geaagaacac cctgtacctc caaatgagca gtctgaggte tgaggacacg	1020
gccatatatt actgtgcaag agataatagg gttaccatga gatacttga tgcttggggc	1080
gcagggacca eggtaaccgt ctctcagga ggaggcggat ctggcgggtg cggatcggac	1140
ategagetca ctcaagtctc egcaateatg tctgcattc caggggaaaa ggtaecatg	1200
acctgcagtg ccagctcaag tgtaaactac ttgcactggt accagcagaa gtcatecaact	1260
tececaaac tetggattta tgacaatcc caectggett ctggagtecc aggtegett	1320
agtggcagtg ggtctggaaa ctcttactct ctcaagatca gcagcatgga ggctgaagat	1380

[0003]

gttgcactt attactgttt tcaggggagt ggtacceat acacgttcgg gggaccaage	1440
tggagctgaa aceggcgccc gctaa	1465
<210> 2	
<211> 732	
<212> DNA	
<213> 环丙沙星单链抗体	
<400> 2	
atgceccagg tgaagctgca gcagctctggg ggaggettag tgaagctctgg agggctcctg	60
aaacctctct gtgtagectc tggatctact ttcagctact atgceatgtc ctgggttcgc	120
cagactcagg aaaagagget ggaatgggtc gcaageatta ctcttggtgg tcttacacc	180
cagctccag acagctgtaa gggctgatc accatctcca gagaagatgg caagaacacc	240
ctgfacctcc aatgagcag tctgaggtct gaggacaagg ccatatatta ctgtgcaaga	300
gataataggg ttaccatgag atacttcgat gcttggggcg caggaccac ggtcacctc	360
tcctcaggag gtggcggctc agggcgagc ggatctggcg gaggggate tggcggtgac	420
ggatcggaca ttgagctcac ccagctctcc gcaatcatgt ctgcatctc aggggaaaag	480
gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaactact tgccttgcca ccagcagaag	540
tcctcactt cccccaaact ctgatttat gacacatccc acctgcttc tggagctcca	600

[0004]

ggtegettea gtggcagtgg gtctggaaac tcttactetc tcaecatcag cagcatggag	660
gctgaagatg ttgccaetta ttaetgtttt caggggagtg ggtacceata caegtteggg	720
gcaccaaget ga	732
<210> 3	
<211> 716	
<212> DNA	
<213> 克伦特罗单链抗体	
<400> 3	
atggeccagg tgcagctgea ggagtctggg ggaggcttag tgaagtctgg agggteectg	60
aaacctctct gtgtagctctc tggattcaact tteagtaect atgceatgct ctgggttege	120
cagactccgg aaaagagget ggaatgggct gcaageatta ctcttggtgg tegttacacc	180
cagtctccag acagtgtgaa gggtegatcc accatctcca gagacgatgg caagaacacc	240
ctgtacctcc aatgagcag tctgaggctt gaggacacgg ccatatatta ctgtgcaaga	300
gataataggg ttaccatgag atacttegat gectggggcg cagggaccac ggteaccgtc	360
tcctcaggag gaggeggate tggcggtggc ggateggaca tegagctcac teagtctccc	420
gcaatcatgt ctgeatctcc aggggaaaag gtcacatga cctgcagtgc cagctcaagt	480
gtaaactact tgcactggta ccagcagaag teatccaett cccccaaact ctggatttat	540

[0005]

gacacatecc acctggettc tggagtecca ggtegettca gtggcagtgg gtctggaaac 600

tettaetete teagatcag cagcatggag getgaagatg ttgceactta ttactgtttt 660

caggggagtg ggtacecata cacgtteggg ggaccaagct ggagctgaaa cegtaa 716

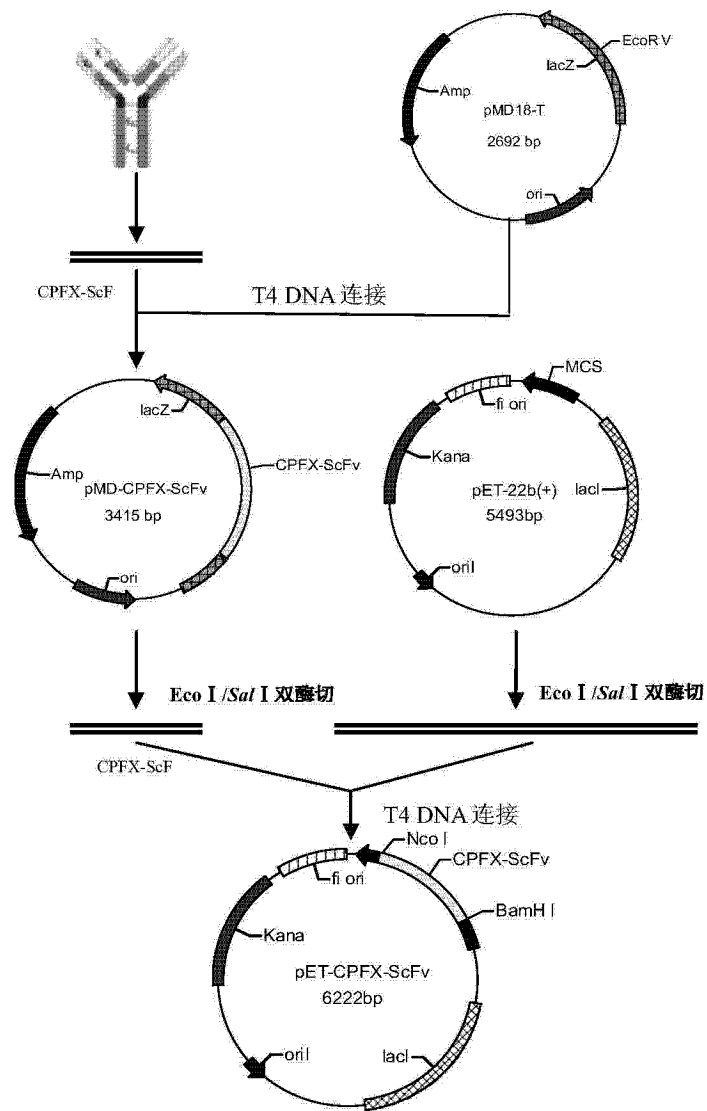


图 1

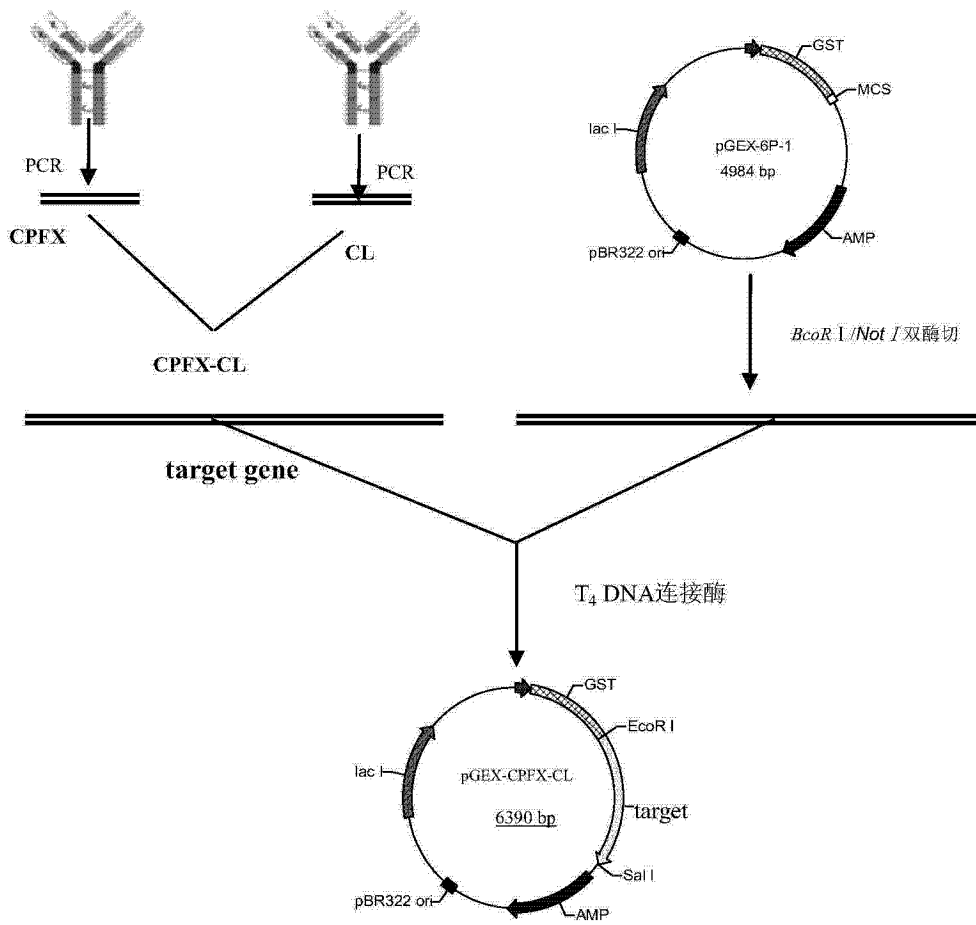


图 2

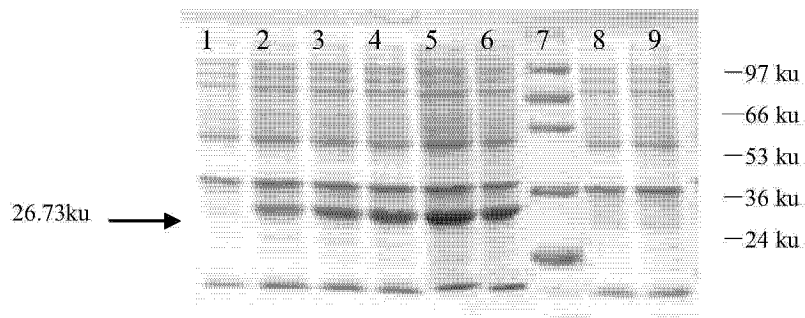


图 3

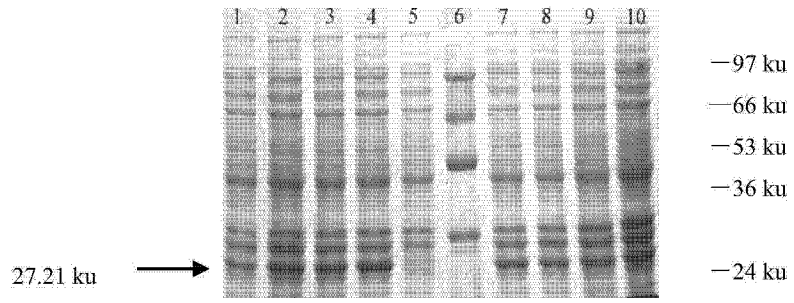


图 4

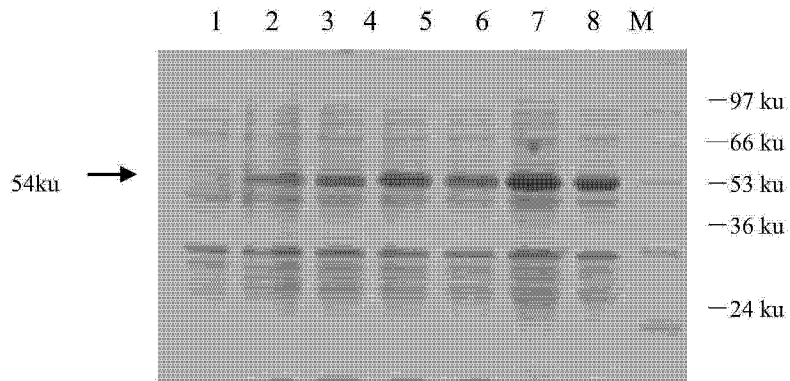


图 5

专利名称(译)	一种环丙沙星与克伦特罗双特异性融合抗体及其应用		
公开(公告)号	CN103694354A	公开(公告)日	2014-04-02
申请号	CN201310749804.7	申请日	2013-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	黑龙江八一农垦大学		
申请(专利权)人(译)	黑龙江八一农垦大学		
当前申请(专利权)人(译)	黑龙江八一农垦大学		
[标]发明人	王颖 张东杰 柳增善 姚笛 霍方珍		
发明人	王颖 张东杰 柳增善 姚笛 霍方珍		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/13 C12N15/70 C12N1/21 G01N33/53		
代理人(译)	王玉松		
其他公开文献	CN103694354B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种环丙沙星与克伦特罗双特异性融合抗体及其应用，属于免疫快速筛检技术领域。本发明通过将环丙沙星单链抗体和克伦特罗单链抗体的VH和VL基因进行整合得到能同时与上述2种残留药物发生反应的多特异性抗体。以此多联特异性融合单链抗体为探针建立一种快速的免疫学检测方法，从而达到一次性、快速、筛检多种残留药物的目的。