



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103694354 B

(45) 授权公告日 2016.06.29

(21) 申请号 201310749804.7

数据库(电子期刊)《医药卫生科技辑》.2008,(第11期),参见前言第37,98页,136-142页.

(22) 申请日 2013.12.31

审查员 刘婷

(73) 专利权人 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)

(56) 对比文件

王颖.“同步筛检三种残留药物的快速检测方法的探索性研究”.《中国博士学位论文全文数据库》.

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,其特征在於,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伦特罗单链抗体;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;编码所述融合抗体的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 根据权利要求1所述的融合抗体,其特征在於,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。

3. 编码权利要求1所述融合抗体的基因,其特征在於,核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

4. 含有权利要求3所述基因的质粒或细胞。

5. 获得权利要求1所述融合抗体的方法,其特征在於,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℃条件下诱导表达。

6. 权利要求1所述融合抗体在残留药物检测中的应用;所述残留药物为环丙沙星或克伦特罗。

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Fc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Fc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℃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℃连接过夜,备用。
 [0025] 表1pET-22b-CPFX-ScFv双酶切体系

成分	体积 (μ L)
10 \times K Buffer	5
1%BSA	5
<i>Eco</i> R I	2
<i>Sa</i> I	2
质粒 DNA	20
ddH ₂ O	16
Total	50

[0026]

[0027] 表2pET-22b-CL-ScFv双酶切体系

成分	体积 (μL)
10×K Buffer	5
1%BSA	5
<i>Sa</i> I	2
<i>Nor</i> 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

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℃振荡培养其D₆₀₀值约达0.6,加入终浓度为1mM的IPTG,分别于37℃和25℃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6000rpm4℃离心16min,弃上清,用pH7.4的PBS悬起后-20℃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℃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℃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℃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℃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℃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

基因	大小	引物序列	酶切位点
CPFX	726 bp	P1: 5' --- GAATTC CAGGTC	ECOR I
		AGCTGCAGCAGTCT-3'	
		P2: 5' --- <u>AGAGCCACCGCCACC</u> CTTGG	
		TGCCCCGAACGTGTAT-3'	
		P3: 5' --- <u>GGTGGCGGTGGCTCT</u> CAGGTC	
		AAACTGCAGGAGTCA-3'	
CL	741bp	P4: 5' --- GCGGCCCGCTTACCGTTT	
		GATTCCAGCTT-3	
		P5: 5' --- <u>GGATCCC</u> AGGTCAGCTGCA	
		GCAGTCT-3	
CPFX-CL	1467 bp	P6: 5' --- GCGGCCCGCTTACCGTTT	Not I
		GATTCCAGCTT-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DH5α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

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

[0042]

	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)
[0043]	phi 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

基因	扩 增 条 件
CPEX	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

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600μL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 μ L-600 μ L的1 \times 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 μ L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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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)

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
CPFV	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

抗体稀释倍数*1000	三种药物检测抗原(μg/100μL)				阴性对照	空白
	2	1	0.5	0.25		
CPFV-McAb	2.914	2.571	1.995	1.871	0.181	0.057
CPFV-ScFv	1.972	1.821	1.607	1.494	0.183	0.063
pGEX - CPFV-CL	1: 8	0.721	<u>0.428</u>	0.406	0.474	0.185
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
pGEX - CPFV-CL		0.657	0.601	<u>0.551</u>	0.445	0.182

[0070] 注:下划线表示最低的有效值。

[0071] 表10间接ELISA同步测定pGEX-CPFV-CL表达产物对两种兽药的免疫学活性(OD₄₉₀)

[0072]

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-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	0.133	0.158	0.161	0.137	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

atggcccagg tgaagetgea gcagtetggg ggaggettag tgaagtctgg agggteectg 60

aaacctect gtgtagectc tggatctact tteagtaect atgcaatgct etgggttege 120

cagaectcgg aaaagagget ggaatgggtc geaagcatta ctcttggtgg tegtacace 180

cagtetccag acagtgtgaa gggtegatcc accatctcca gagacgatgg caagaacace 240

ctgtacctec aatgagcag tctgaggctt gaggacaegg ccatatatta ctgtcaaga 300

gataataggg ttaccatgag ataactegat gcttggggcg cagggaccac ggteaccgctc 360

tctcaggag gtggcggttc aggeggagge ggatctggcg gaggeggate tggegggtgce 420

[0002]

ggateggaca ttgageteac ceagtetecc geaatcatgt ctgcatetcc aggggaaaag	480
gteacecatga cctgcagtgc cageteaagt gtaaactact tgegetggca ccagcagaag	540
teatccaactt ececcaaact ctggatttat gacacatecc acctggettc tggagtccca	600
ggtegettea gtggcagtgg gletggaaac tetfactetc tcacgatcag cagcatggag	660
gctgaagatg ttgccaatta ttactgtttt caggggagtg ggtacceata cacgtteggg	720
gcaccaaget gaggtggcgg tggctctcag gtgcagctgc aggagtctgg gggaggetta	780
gtgaagtctg gagggtcect gaaacectcc tgtgtagect ctggatteac ttteagtaec	840
tatgceatgt cctgggtteg ccagactccg gaaaagagge tggaatgggt cgcaagcatt	900
actcttgggtg gtegttaeac ceagtetecc gacagtgtga agggtegatt caccatctec	960
agagaecatg gcaagaacac cctgtaecte caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg	1020
gccatatatt actgtgcaag agataatagg gttaccatga gatacttga tgectggggc	1080
gcagggacca cggteaccgt ctctcagga ggaggeggat ctggcgggtg cggateggae	1140
afegagctea ctcagtetec cgcaatcatg tetgcatetc caggggaaaa ggteaccatg	1200
acctgcagtg ceageteaag tgtaaactae ttgcactggt accagcagaa gteatccact	1260
tececcaaac tetggattta tgacacatcc caectggett ctggagtccc aggtegettc	1320
agfggcagtg ggtetggaaa ctetfactet cteagatca geagcatgga ggctgaagat	1380

[0003]

gttgccaett attactgttt teaggggagt gggfacecat acacgttcgg gggaccaage 1440

tggagctgaa accggegccc gctaa 1465

<210> 2

<211> 732

<212> DNA

<213> 环丙沙星单链抗体

<400> 2

atggeccagg tgaagctgca geagtctggg ggaggettag tgaagtctgg agggfcccctg 60

aaaccctect gtgtagecte tggattcaet tteagtaect atgceatgc ctgggttege 120

eagactccgg aaaagaggct ggaatgggct geaagcatta ctcttggtgg tegtacacc 180

cagtetccag acagtgtgaa gggtegatte accateteca gagacgatgg caagaacacc 240

ctgtaectee aaatgagcag tetgaggtct gaggacacgg ccatatatta ctgtgcaaga 300

gataataggg ttaccatgag ataactegat gectggggcg cagggaccac ggteaccgctc 360

tcctcaggag gtggcggctc aggcggagge ggatctggcg gaggcggate tggcgggtggc 420

ggateggaca ttgageteac ccagtetccc geaatcatgt ctgeatetcc aggggaaaag 480

gtcaccatga cctgcagtgc cagetcaagt gtaaaactact tgecctggca ccagcagaag 540

tcatecactt cccccaaact ctggatttat gacacatecc acctggette tggagtecca 600

[0004]

ggtegettca gtggeagtgg gtetggaaac tettactete tcaegatcag cagcatggag 660

gctgaagatg ttgccaetta ttaetgtttt caggggagtg ggtacceata cacgttcggg 720

geaccaaget ga 732

<210> 3

<211> 716

<212> DNA

<213> 克伦特罗单链抗体

<400> 3

atggeccagg tgcagetgca ggagtetggg ggaggettag tgaagtetgg agggteectg 60

aaacectect gtgtagecte tggattcaact ttcagtacct atgceatgic ctgggttegc 120

cagactcggg aaaagagget ggaatgggic geaagcatta ctcttggtgg tegtacacc 180

cagtetccag acagtgtgaa gggtegatc accateteca gagaecatgg caagaacacc 240

ctgtacctcc aatgagcag tetgaggtet gaggacacgg ccatatatta ctgtgcaaga 300

gataataggg ttaccatgag atacttegat gectggggcg cagggaccac ggteaccgtc 360

tecteaggag gaggcggate tggcgggtgc ggateggaca tegagetcac teagtetecc 420

geaatcatgi ctgcatctcc aggggaaaag gteaccatga cctgeagtgc cagctcaagt 480

gtaaactact tgeactggfa ccagcagaag teatecaett cccccaaact ctggatttat 540

[0005]

gacacatecc acctggettc tggagtecca ggtegettea gtggeagtgg gtctggaaac 600

tettactete tcacgatcag cagcatggag getgaagatg ttgecaetta ttactgtttt 660

caggggagtg ggtacceata caegtteggg ggaccaaget ggagctgaaa ccgtaa 716

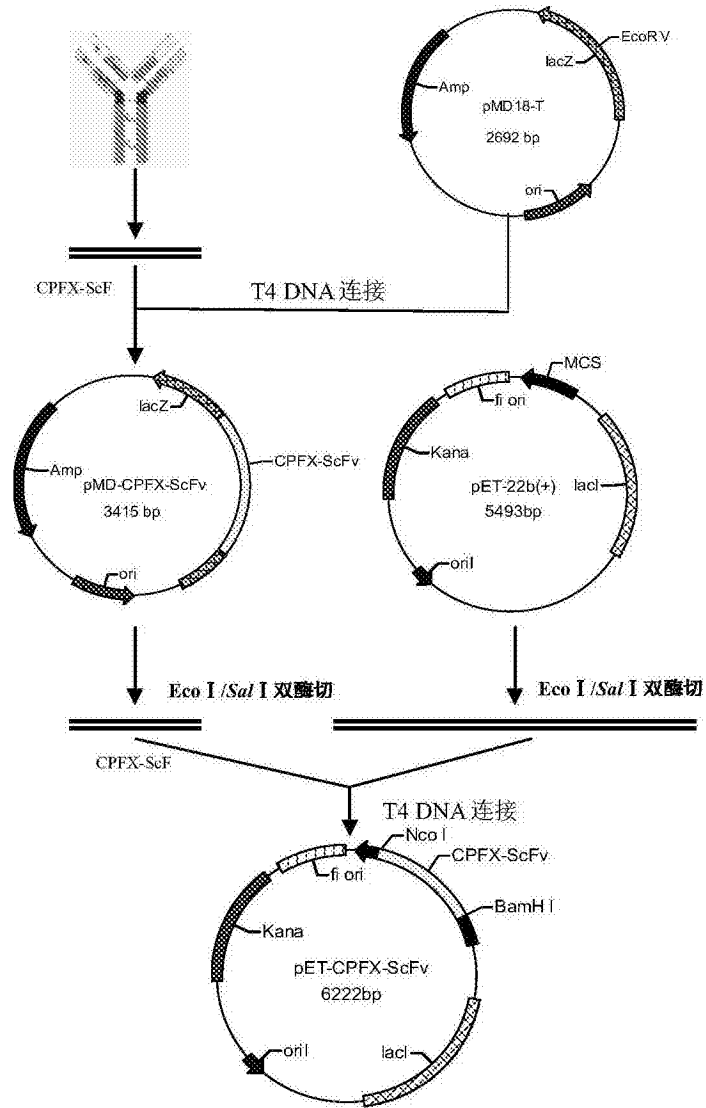


图1

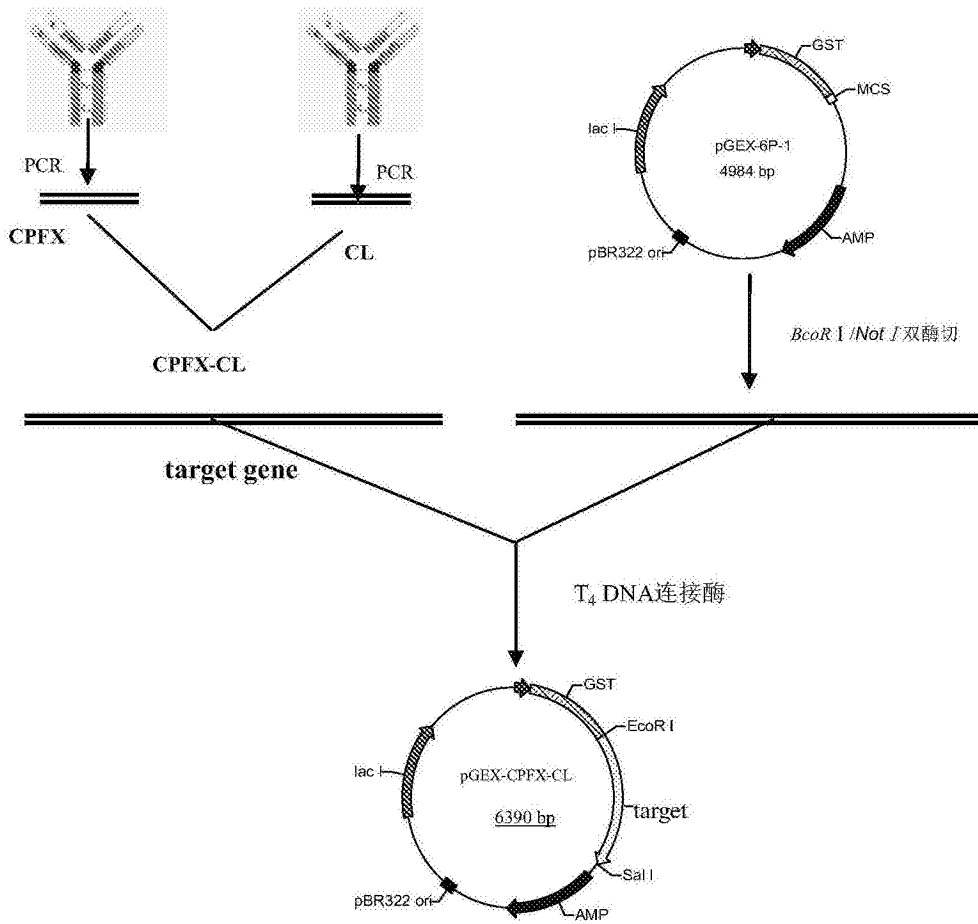


图2

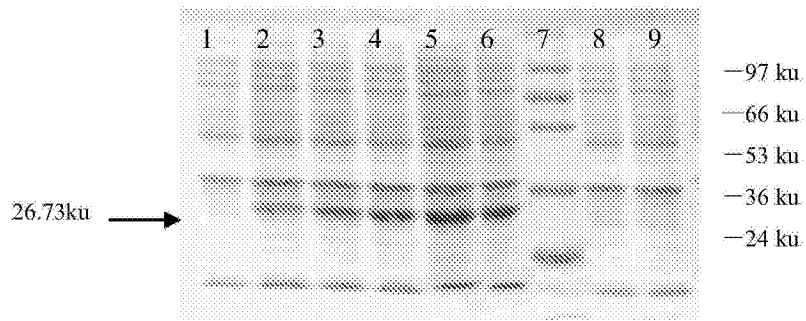


图3

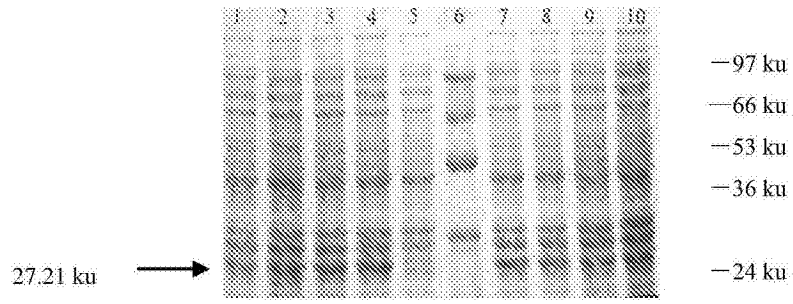


图4

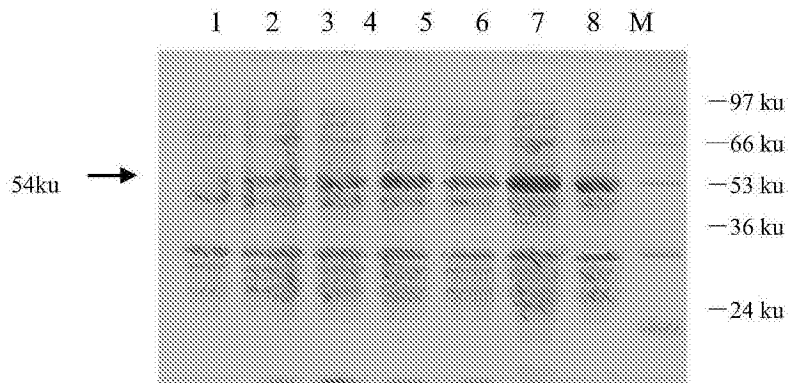


图5

专利名称(译)	一种环丙沙星与克隆特罗双特异性融合抗体及其应用		
公开(公告)号	CN103694354B	公开(公告)日	2016-06-29
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		
审查员(译)	刘婷		
其他公开文献	CN103694354A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种环丙沙星与克隆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隆特罗单链抗体的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。

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