



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105218677 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 06

(21) 申请号 201510694808. 9

(22) 申请日 2015. 10. 21

(71) 申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866 号

(72) 发明人 郭逸蓉 刘蕊 梁晓 项丹丹
陈梦丽 朱国念

(74) 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公
司 33212

代理人 金祺

(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)

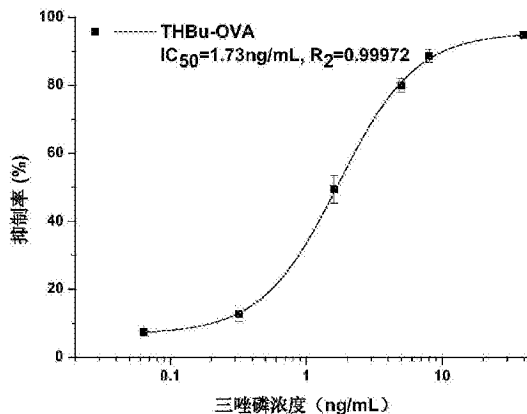
权利要求书1页 说明书7页
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

抗三唑磷单链抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种抗三唑磷单链抗体及其用途,涉及基因工程、抗体工程技术领域和免疫学检测领域。具体而言,本发明公开了一种抗三唑磷单链抗体,其氨基酸序列由重链可变区、连接肽和轻链可变区组成,连接肽位于重链可变区和轻链可变区之间。本发明还同时公开了编码上述抗三唑磷单链抗体的基因。本发明的抗三唑磷单链抗体能用于三唑磷农药的检测。



1. 抗三唑磷单链抗体,其特征是:该抗体为 SEQ ID No :1 所示的氨基酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的抗三唑磷单链抗体,其特征是:该氨基酸序列由重链可变区、连接肽和轻链可变区组成,连接肽位于重链可变区和轻链可变区之间。
3. 抗三唑磷单链抗体,其特征是:是权利要求 1 所述抗三唑磷单链抗体经过改造得到的衍生抗体,改造包括氨基酸缺失、突变或插入形成的具有抗三唑磷生物活性的单链抗体。
4. 编码权利要求 1、2 或 3 所述的抗三唑磷单链抗体的基因,其特征是:该抗体基因为 SEQ ID No :2 所示的核苷酸序列。
5. 根据权利要求 4 所述的基因,其特征是:该基因由所述重链可变区、连接肽和所述轻链可变区核苷酸序列组成。
6. 含有权利要求 4 或 5 所述基因的克隆载体或菌株。
7. 含有权利要求 4 或 5 所述基因的表达载体或宿主。
8. 根据权利要求 7 所述的表达载体或宿主,其特征是:
所述表达载体为将所述抗体基因插入 PIT2 载体得到的重组质粒;
所述宿主为将所述重组质粒转化大肠杆菌得到的基因工程菌。
9. 制备如权利要求 1、2 或 3 所述的抗三唑磷单链抗体的方法,其特征是:将含有权利要求 4 或 5 所述基因的表达载体转化、转导或转染宿主细胞,进行培养后分离蛋白从而获得抗三唑磷单链抗体。
10. 如权利要求 1、2 或 3 所述的抗三唑磷单链抗体的用途,其特征是:用于三唑磷农药的检测。

抗三唑磷单链抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗三唑磷单链抗体及其用途,涉及基因工程、抗体工程技术领域和免疫学检测领域。

背景技术

[0002] 农药是农业生产中用于防治农作物中病、虫、杂草等不可缺少的物质,对保障和促进农业稳产增收有极其重要的作用。然而,在获益的同时,长期不合理的使用使人类面临暴露在农药污染及残留超标的工作、饮食和自然环境中。三唑磷农药是一种广谱有机磷杀虫剂,主要靶标是昆虫的神经系统,广泛用于防治农作物的害虫危害,已有研究表明即使暴露在较低三唑磷环境中,对哺乳动物的正常生理、激素水平、组织均可产生明显影响。国内外已开始限制或禁止三唑磷农药的使用与销售,英国 HSE 机构对三唑磷浓度最低检出限要求已达到 0.01mg/kg。为保护人类的健康和安全,对该农药的残留进行有效监控显得尤为必要,具有重要意义。

[0003] 现有的三唑磷检测方法有气相色谱法、液相色谱法以及基于第二代抗体的酶联免疫吸附分析的方法。其中仪器方法需要价格昂贵的仪器和具备专业技能的操作人员;而基于单克隆抗体的免疫反应,需要长期保存杂交瘤细胞,定期驯化保证分泌性能,若杂交瘤细胞突变或保存不当,则需要重新制备。然而,第三代抗体之基因工程抗体的产生规避了优异的杂交瘤细胞因保存不当损失的风险,节省了实验动物饲养时间某种程度上,抗体片段的获得使得具备良好性能的抗体特性得以永存,并且具备遗传信息可改造,生产形式多样化的优势,在技术操作上简单方便,易于投入生产。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是提供一种特异性强、灵敏度高、制备方便的抗三唑磷的单链抗体及在检测三唑磷中的应用。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种抗三唑磷单链抗体,该抗体为 SEQ ID No.:1 所示的氨基酸序列。

[0006] 作为本发明的抗三唑磷单链抗体的改进:该氨基酸序列由重链可变区、连接肽和轻链可变区组成,连接肽位于重链可变区和轻链可变区之间。

[0007] 备注说明:所述重链可变区如 SEQ ID No.:1 自 N 端第 1 至 123 位氨基酸残基所示,所述连接肽如 SEQ ID No.:1 自 N 端第 124 至 138 位氨基酸残基所示,所述轻链可变区见 SEQ ID No.:1 自 N 端第 139 至 247 位氨基酸残基所示。

[0008] 本发明还同时提供了另一类的抗三唑磷单链抗体,是上述单链抗体经过改造得到的衍生抗体,改造包括氨基酸缺失、突变或插入形成的具有抗三唑磷生物活性的单链抗体。

[0009] 本发明还同时提供了编码上述抗三唑磷单链抗体的基因,该抗体基因为 SEQ ID No.:2 所示的核苷酸序列(741 个核苷酸)。

[0010] 作为本发明基因的改进,该基因由所述重链可变区、连接肽和所述轻链可变区核

苷酸序列组成。

[0011] 所述重链可变区如 SEQ ID No :2 自 5' 末端第 1 至 369 位核苷酸所示；

[0012] 所述连接肽如 SEQ ID No :2 自 5' 末端第 370 至 414 位核苷酸所示；

[0013] 所述轻链可变区如 SEQ ID No :2 自 5' 末端第 415 至 741 位核苷酸所示。

[0014] 本发明还同时提供了含有上述基因的克隆载体或菌株。

[0015] 本发明还同时提供了含有上述基因的表达载体或宿主；所述表达载体为将所述抗体基因插入 PIT2 载体得到的重组质粒；所述宿主为将所述重组质粒转化大肠杆菌得到的基因工程菌。

[0016] 本发明还同时提供了制备上述抗三唑磷单链抗体的方法：将含有上述基因的表达载体转化、转导或转染宿主细胞，进行培养后分离蛋白从而获得抗三唑磷单链抗体。

[0017] 本发明还同时提供了上述抗三唑磷单链抗体的用途：用于三唑磷农药的检测。

[0018] 抗体基因的表达载体可为本领域常规的可在宿主内复制和表达的各种载体，具体可为将所述抗体基因插入 PIT2 载体得到的重组质粒，更具体可为将所述抗体基因插入 PIT2 质粒的 NcoI 和 NotI 酶切位点之间得到的重组质粒。所述宿主可为原核细胞，如细菌细胞；真核细胞，如昆虫、酵母、哺乳动物细胞等，具体可为将所述重组质粒转化大肠杆菌得到的基因工程菌，更具体可为将所述重组质粒转化大肠杆菌 HB2151 菌株得到的基因工程菌。本发明还包括将含所述单链抗体基因的表达载体转化、转导或转染宿主细胞，进行培养后分离蛋白从而获得抗三唑磷单链抗体的制备方法，具体可为发酵培养所述基因工程菌，得到所述单链抗体。本发明保护任一所述单链抗体在三唑磷农药检测中的应用。

[0019] 本发明的单链抗体以杂交瘤细胞株为基因来源，选用亚型特异性的简并引物对抗体可变区进行正确扩增，获得特性优良的抗体片段。通过原核表达系统表达该抗体片段，低成本，快速制备了具备生物活性的单链抗体，省去了免疫、饲养动物的繁琐工序，同时也免去了文库建立和筛选的较高技术要求，减少了非目的抗体的干扰。本发明的三唑磷单链抗体对三唑磷具有高灵敏度和识别特异性，适用于三唑磷残留样品的快速免疫检测，将在三唑磷检测中发挥巨大应用潜力。

附图说明

[0020] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0021] 图 1 为以三唑磷杂交瘤细胞的 cDNA 为模板，PCR 扩增抗体重链可变区基因、轻链可变区基因。通过柔性连接肽基因，将重链可变区基因和轻链可变区基因进行重叠延伸 PCR，获得全长单链抗体基因；

[0022] 图中：M：DL-2000DNA 分子量 Marker，VH：抗体重链可变区基因，VL：抗体轻链可变区基因，scFv：抗三唑磷单链抗体全长基因。

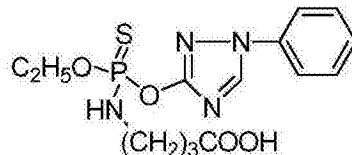
[0023] 图 2 是单链抗体在培养基上清和大肠杆菌周质空间中的可溶表达，免疫印迹法验证。图中：M：蛋白分子量，Medium：培养基上清中单链抗体；Periplasm：周质空间内单链抗体。

[0024] 图 3 是单链抗体对三唑磷的竞争曲线。

具体实施方式

[0025] 以下结合实施例便于更好地理解本发明,下述实施例是说明性的,并不限定本发明,不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。如无特殊说明,以下实施例中的实验方法均为常规方法,试验材料均为常规生化试剂商店购买得到。如无特殊说明,实施例中所用的 TES 缓冲液为 0.2mol/L pH8.0 Tris-HCl, 包含 0.5mmol/L EDTA、0.5mol/L 蔗糖, 实施例中所用的纯化缓冲液均为 0.02mol/L pH 7.4 Tris-HCl 包含 500mM NaCl。如无特殊说明, 实施例中所用的 CBS 缓冲液均为 0.05mol/L pH 9.6 的碳酸钠缓冲液, 实施例中所用的 PBS 缓冲液均为 0.01mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液。鸡血清白蛋白简称 OVA, 半抗原 THBu 如下式:

[0026]



THBu

[0027] 实施例 1: 单链抗体的扩增

[0028] 1. 抗体重链、轻链可变区基因扩增

[0029] 本实验筛选所得新鲜单克隆细胞株 8C10 (分泌抗三唑磷特异性单克隆抗体), 亚型 IgG1/ λ 。取均一性、纯度良好的 5×10^6 个杂交瘤细胞, 提取总 RNA 并纯化得到 mRNA, 反转录合成第一条 cDNA 链。使用亚型特异性的简并引物对, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 分别获得重链可变区基因 (VH)、轻链可变区基因 (VL), 分别克隆至 Blunt zero 载体并转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞后测序, 序列经数据库 Blast 比对后, 鉴定出功能域完整、亚型相符和正确表达框的 VH 和 VL 基因。

[0030]

引物名称	序列 (5'-3')	扩增片段
VHF	SARGTNMAGCTGSAGSAGTC	IgG1 重链
VHR	TGGGGSTGTYGTTTTGGCTGMRGAGACRGTGA	
VLF	GGGAATTCATGGCCTGGAYTYCWCTYWTMYTCT	λ 轻链
VLR	CCCAAGCTTAGCTCYTCWGWGGAIGGYGGRAA	

[0031] 备注说明:

[0032] VH 基因 (对应重链可变区) 如 SEQ ID No :2 自 5' 末端第 1 至 369 位核苷酸所示;

[0033] VL 基因 (对应轻链可变区) 如 SEQ ID No :2 自 5' 末端第 415 至 741 位核苷酸所示。

[0034] 2. 构建单链抗体片段

[0035] 根据上述经测序鉴定的重链和轻链可变区基因设计上下游引物, 通过柔性连接肽 (Linker) 连接, 构建 VH-Linker-VL 串联方式的单链抗体 (scFv) 片段。

[0036] 为构建重组载体, 重链上游引入 NcoI 酶切位点 (下划直线) 和两个胞嘧啶碱基 (C), 轻链下游引入 NotI 酶切位点 (下划波浪线), 重链下游和轻链上游引入部分 Linker 序列, 保证正确的表达框, 具体通过重叠延伸 PCR (SOE-PCR) 方法拼接串联, 获得的全长 scFv

基因,进一步 scFv 基因克隆至 Blunt zero 载体并转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞后测序并进行序列分析。scFv 序列如序列表的序列 2 (SEQ ID No :2) 所示,重链可变区的编码序列见序列 2 自 5' 末端第 1 至 369 位核苷酸所示,连接肽的编码序列见序列 2 自 5' 末端第 370 至 414 位核苷酸所示,轻链可变区的编码序列见序列 2 自 5' 末端第 415 至 741 位核苷酸所示。

[0037]

引物名称	序列 (5'-3')	扩增片段
NcoI-cc-VHF	<u>CCATGGCCGAAGTGCAGCTGGAGGAGTC</u>	
VHR-Linker	GCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCAC CGGCTGTTGTTTTGGCTGAAG	scFv 片段, 含 NcoI、NotI 酶
Linker-VLF	TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATC GGCTGTTGTGACTCAGGAATC	切位点
VLR- NotI	<u>GCGGCCGCGCCTAGGACAGTCAGTTTG</u>	

[0038] 备注说明:

[0039] PCR 扩增的体系为:

[0040]

重叠拼接体系 25 μ L: g-NcoI-cc-VH-Linker 50ng
 Linker-VL-NotI 50ng
 5 \times 缓冲液 5 μ L
 dNTPs(2.5mM) 2.5 μ L
 pfu 0.5 μ L
 无菌水 定容至 25 μ

PCR 扩增的程序为: 95 $^{\circ}$ C 1min
 95 $^{\circ}$ C 1min
 57 $^{\circ}$ C 1min
 72 $^{\circ}$ C 1min } 20 个循环

[0041] 所得 PCR 产物用于延伸体系。

[0042]

延伸体系 50 μ L: 拼接产物	25 μ L
NcoI-cc-VHF	0.5 μ L
VLR- NotI	0.5 μ L
5 \times 缓冲液	5 μ L
dNTPs(2.5mM)	2.5 μ L
pfu	0.5 μ L
无菌水	定容至 50 μ L

PCR 扩增的程序为: 95 $^{\circ}$ C	1min	
95 $^{\circ}$ C	1min	} 30 个循环
61 $^{\circ}$ C	1min	
72 $^{\circ}$ C	1min	
72 $^{\circ}$ C	5min	

[0043] 所得产物为 scFv 全长基因。

[0044] 实施例 2 :单链抗体的制备

[0045] 1. 表达载体的构建和基因工程菌制备

[0046] 将含 SEQ ID No :2 所示的单链抗体基因的克隆载体 (实施例 1 所得), 用限制性内切酶 NcoI 和 NotI 进行双酶切反应, 回收酶切后的单链抗体片段。用限制性内切酶 NcoI 和 NotI 双酶切 PIT2 载体质粒, 回收酶切后的载体骨架。将双酶切后的单链抗体片段和载体骨架连接, 产生重组质粒, 进行测序。经过测序结果分析, 重组载体的结构描述如下 : 在 PIT2 载体的 NcoI 和 NotI 酶切位点之间插入 SEQ ID No :2 所示的单链抗体基因片段, 在片段 5' 端与载体骨架上的信号肽 pelB 编码序列相接, 3' 端与载体骨架上的 His-tag 标签、myc-tag 标签编码序列融合。将构建的重组质粒转化大肠杆菌 HB2151, 得到具有氨苄抗性的基因工程菌。

[0047] 2. 单链抗体的表达与纯化

[0048] 将步骤 1 构建的基因工程菌按 1:100 体积比接种至 2 \times YT 培养基中, 加入 100 μ g/mL 氨苄青霉素 (Amp) 和 1% 质量浓度的葡萄糖 (G), 37 $^{\circ}$ C 200rpm 活化过夜 (约 12 小时)。次日, 将活化过夜的 2mL 工程菌接种至 200mL 2 \times YT (含 100 μ g/mL Amp, 0.1% G) 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 200rpm 振荡培养至 OD600 = 0.9, 加入 IPTG 至终浓度为 1mM, 37 $^{\circ}$ C 200rpm 诱导表达过夜。3300g 离心 30min 收集培养基上清和菌体沉淀, 上清 4 $^{\circ}$ C 保存。沉淀重悬于 10mL TES 缓冲液中, 充分混匀, 加入 15mL 1/5TES 缓冲液 (无菌水稀释, 即, TES 缓冲液与无菌水按照 1:4 的体积比混合) 混匀后冰浴 1h, 12000g 4 $^{\circ}$ C 离心 20min 获得周质空间表达的单链抗体, 于 PBS 缓冲液中 4 $^{\circ}$ C 透析过夜。

[0049] 镍金属离子亲和层析法纯化上清与周质空间中的抗三唑磷单链抗体。5 倍柱体积的无菌水和 5 倍柱体积含 10mM 咪唑的纯化缓冲液依次过 1mL HisTrapTMHP 预装柱 (GE Healthcare) 进行柱子清洗和平衡。将预先超滤浓缩至 2mL 的上清以及周质空间中的单链抗体样品, 分别加入 8mL 含 10mM 咪唑的纯化缓冲液稀释, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后, 按 1mL/

min 流速使滤液充分结合纯化柱。加入 10 倍柱体积的含 10mM 咪唑的纯化缓冲液去除未结合杂蛋白,1 倍柱体积含 50mM、100mM 咪唑的纯化缓冲液洗去结合力弱的杂蛋白。最后加入含 200mM 咪唑的纯化缓冲液洗脱目的蛋白,收集洗脱液,得到单链抗体溶液;备注说明:上述洗脱液的流速均为 1mL/min。进行 Western blot 和蛋白质谱鉴定。Western blot 检验结果表明:上清以及周质中表达的蛋白均具有与 myc 标签抗体结合的功能,所得的单链抗体均满足以下条件:单链抗体的分子量为 31kD,与预期蛋白分子量一致。经过软件翻译和质谱鉴定结果比对,单链抗体氨基酸序列如序列列表的序列 1 (SEQ ID No :1) 所示。SEQ ID No :1 中,重链可变区自 N 端第 1 至 123 位氨基酸残基所示,连接肽基因自 N 端第 124 至 138 位氨基酸残基所示,轻链可变区自 N 端第 139 至 247 位氨基酸残基所示。

[0050] 实施例 3 :单链抗体的应用

[0051] 1. 单链抗体的反应灵敏度

[0052] 混合酸酐法制备人工抗原 THBu-OVA。采用 CBS 稀释抗原至包被浓度 10 μ g/mL,96 孔中加入 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h 后洗板,2%脱脂奶粉-PBS 封闭 1h 并洗板三次。每孔加入 50 μ L 不同浓度(即,终浓度分别为 0.064、0.32、1.6、5、8、40ng/mL)的三唑磷标样(PBS 为空白溶剂对照),设三个重复孔,每孔加入 50 μ L 实施例 2 制备的单链抗体溶液,使对照孔吸光值在 1 左右。37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后洗板三次。每孔加入 100 μ L 抗 myc-tag 的鼠单克隆抗体(北京康为生物技术有限公司),37 $^{\circ}$ C 反应 1h 后洗板三次。每孔加入 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 抗体(sigma),37 $^{\circ}$ C 反应 1h 后洗板三次。加入 TMB 显色液,避光显色 15min 后,每孔加入 50 μ L 2mol/L 硫酸中止反应,测定 OD₄₅₀值。以三唑磷浓度对数值为横坐标,抑制率为纵坐标,经 Origin 8.5 拟合四参数方程,测定 IC₅₀值。结果表明吸光值与每孔所加入的标准品溶液中三唑磷的浓度成反比,并且对 OVA 无阳性反应,说明表达纯化得到的单链抗体具有针对三唑磷的结合特异性,对三唑磷的识别灵敏度达到 1.73ng/mL。

[0053] 2. 单链抗体的交叉反应率及检测方法的评价

[0054] 反应过程同步骤 1。每孔加入 50 μ L 不同浓度的某种有机磷类农药(分别为对硫磷、甲基对硫磷、毒死蜱、倍硫磷、辛硫磷、水胺硫磷、杀螟硫磷),每个浓度设置 3 个重复孔。交叉反应率按公式计算:CR(%) = [IC₅₀(三唑磷)/IC₅₀(某种有机磷农药)] \times 100%。单链抗体对几种有机磷农药的交叉反应率均小于 0.1%,表明表达的单链抗体对三唑磷有良好的选择特异性,可用于开发检测三唑磷的快速产品。

[0055] 基于单链抗体的间接竞争酶联免疫吸附方法(ic-ELISA)检测不同水样的添加回收率。自来水(中国,杭州)、西湖水(中国,杭州)和稻田水(中国,浙江诸暨)的 pH 范围 7.0-7.4,过滤后将三唑磷标样添加至每一份水样中,终浓度为 2.5、5 和 7.5ng/mL,50 μ L 每孔加入到已包被 THBu-OVA 并封闭过的 96 孔板中,根据测定的标准曲线,推算抑制率对应的三唑磷实际检测浓度,计算添加回收率,公式为:Recovery(%) = 实际检测浓度 / 理论添加浓度 \times 100,反应设三次试验,每个样品三个重复孔。基于单链抗体的 ic-ELISA 对不同水样中三唑磷的平均添加回收率 96%,添加回收率范围 76-106%,平均批间差异 5.9%,批间差异 1.2%-13%,说明该检测方法具有良好的精确度和准确度,表明抗三唑磷单链抗体可用于免疫检测领域,在开发快速免疫检测方法具有巨大的应用潜力。

[0056] 最后,还需要注意的是,以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然,本发明不限于以上实施例,还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容

直接导出或联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。

[0001]

<110> 浙江大学
 <120> 抗三唑磷单链抗体及其应用
 <160> 2
 <210> 1
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗三唑磷单链抗体
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Tyr Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Ser Pro
 50 55 60
 Asp Asn Leu Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg
 65 70 75
 Asp Ile Leu Tyr Val Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
 80 85 90
 Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Arg Val Leu Asp His Tyr Tyr Leu Thr
 95 100 105
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys
 110 115 120
 Thr Thr Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 125 130 135

[0002]

Gly Gly Ser Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
 140 145 150
 Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala
 155 160 165
 Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Ser Glu
 170 175 180
 Asn Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro
 185 190 195
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala
 200 205 210
 Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr
 215 220 225
 Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly
 230 235 240
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 245 247

<210> 2
 <211> 741
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体基因

<400> 2
 gaagtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttagigaage ctggagggtc cctgacactc 60
 tccgtgcag cctctggatt caetticagt tactatgcca tgtcttgggt tcgccagaact 120
 ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attactggtg gtggtacgac ctactctcca 180
 gacaatttga agggccgatt caccatatcc agagataatg tcaggacat cctgtacgta 240
 caaatgaaca gctcgaggtc tgaggacacg gccatttatt actgtgtaag agtcctcgac 300

[0003]

cattattatt taacggacta ctgggggtcaa ggaacctcag teaccgtctc ttcagccaaa 360
acaacagccg gtggaggcgg ttcaggcgga ggtggctctg gcgggtggcgg atcggtgttt 420
gtgactcagg aatctgcact caccacatca cctggtgaaa cagtcacact cacttgtegc 480
tcaagtactg gggctgttac aaccagtaac fatgccaact gggccaaga aaaatcagaa 540
aatttattta ctggctaat aggiggcacc aacaaccgag ccccaggtgt tcctgccaga 600
ttctcagget ccctgattgg agacaaggct gccctacca tcacaggggc acagactgag 660
gatgaggcaa tatattctg tctctatgg tacagcaacc attgggtgtt cggtggagga 720
accaaetga ctgtctagg c 741

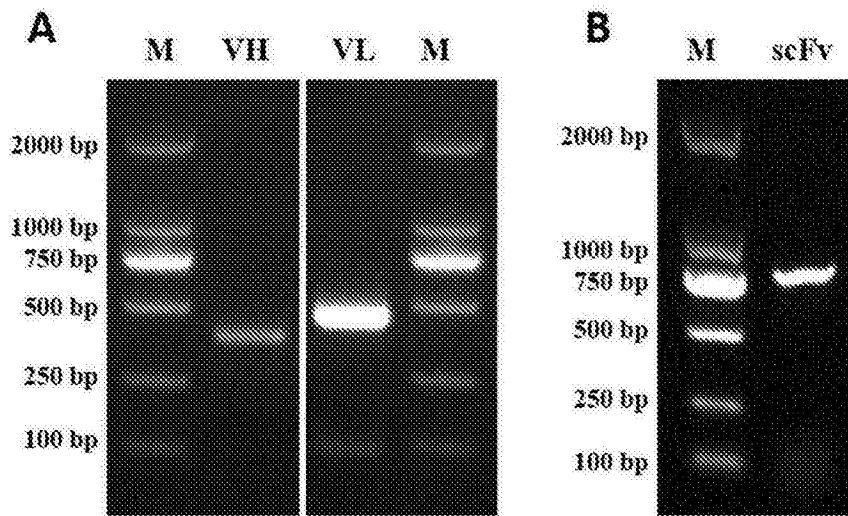


图 1

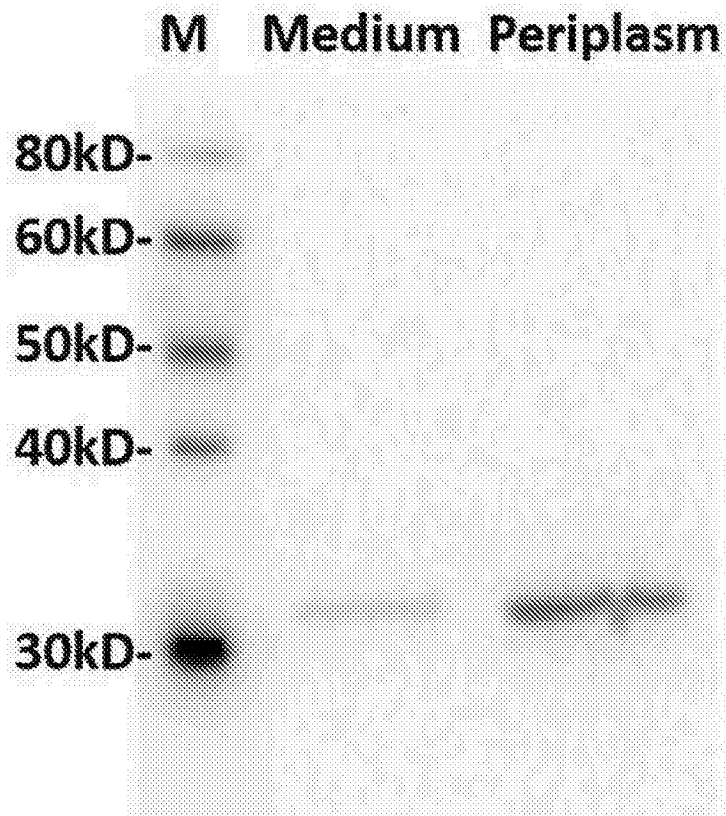


图 2

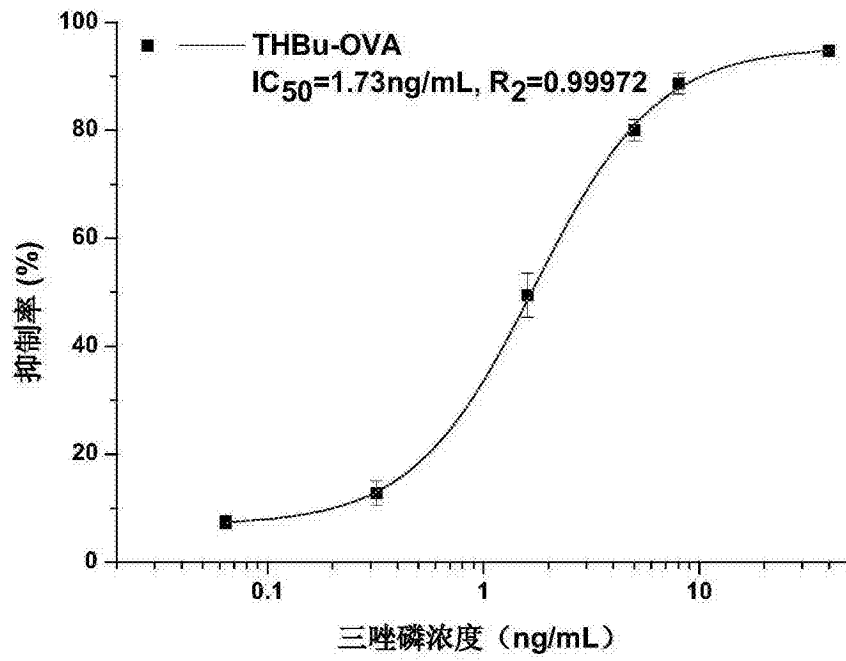


图 3

专利名称(译)	抗三唑磷单链抗体及其应用		
公开(公告)号	CN105218677A	公开(公告)日	2016-01-06
申请号	CN201510694808.9	申请日	2015-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	郭逸蓉 刘蕊 梁晓 项丹丹 陈梦丽 朱国念		
发明人	郭逸蓉 刘蕊 梁晓 项丹丹 陈梦丽 朱国念		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/13 C12N15/70 C12N1/21 G01N33/53		
代理人(译)	金祺		
其他公开文献	CN105218677B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种抗三唑磷单链抗体及其用途，涉及基因工程、抗体工程技术领域和免疫学检测领域。具体而言，本发明公开了一种抗三唑磷单链抗体，其氨基酸序列由重链可变区、连接肽和轻链可变区组成，连接肽位于重链可变区和轻链可变区之间。本发明还同时公开了编码上述抗三唑磷单链抗体的基因。本发明的抗三唑磷单链抗体能用于三唑磷农药的检测。

