



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109738645 B

(45) 授权公告日 2021. 10. 12

(21) 申请号 201811597037.1

G01N 33/535 (2006.01)

(22) 申请日 2018.12.26

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109738645 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2019.05.10

CN 103361741 A, 2013.10.23

CN 103361741 B, 2014.11.05

(73) 专利权人 山东宽和正生物医药有限公司

CN 101955541 A, 2011.01.26

地址 262700 山东省潍坊市寿光市文圣街

CN 1730492 A, 2006.02.08

南兴安路西潍坊科技学院

CN 103451218 A, 2013.12.18

(72) 发明人 董金华 董航 单喜军

US 6132722 A, 2000.10.17

(74) 专利代理机构 山东济南齐鲁科技专利事务

审查员 舒霏霏

所有限公司 37108

代理人 张娟

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

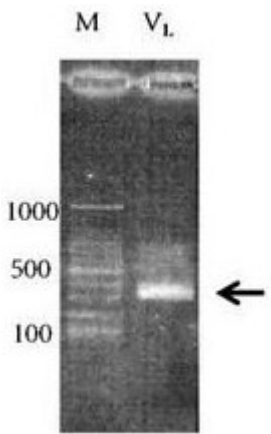
权利要求书3页 说明书9页
序列表7页 附图4页

(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;

其中抗体重链可变区的氨基酸序列为:

EVNLVESGGGLVKPGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTFYPDSVKGRFTISR
DNAKNTLYLQMSSLRSED TAMYYCASDDYKDYFDYWGQGTTLTV;

抗体轻链可变区的氨基酸序列为:

ENVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSNTPKLIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSL
TISSMEAEDVATYYCFQGSYPFTFGSGTKLEIKR;

具体包括以下步骤:

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
GTAAGAAATTCGAGAAAGATACCGGAATTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTCCCACA
GGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGC
CTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACA
ACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGCTGCCGAACCC
GCCAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAAC
CTGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGT
ACGACATTAAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGTTGACCTGATTAATAA
CAAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATC
AACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTTCAAGG
GTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAA
AGAGTTCCTCGAAAACCTATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTA
GCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACCATGGAAAACGCCAGAAAGGTG
AAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGG
TCGTCAGACTGTGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAATAACAATAAC
AACAACCTCGGGATCGAGGGAAGGATTTGAGAATTCGCGTCGACGGAAAATGTGCTACCCAGTCTCCAGCAATCA
TGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCA
GCAGAAGTCAAACACCTCCCCAACTCTGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTGCGTTT
AGTGGCAGTGGGTCTGGAACTCTTACTCTCTACGATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTATTACT
GTTTTTCAGGGGAGTGGGTACCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGAAAATAAAACGTGCGGCCGCACATCA
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:

ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTG
AACCTGGTGAATCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA

CTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCCGACAGCTCCGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAG
TGGTGGTAGTTACACCTTCTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACC
CTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGCGATGATTACAAGGACT
ACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCGAGCTACCGGCGTCGGCCGCACATCATCATACCA
TCACGGGGCCGCAGAACAATACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTTGAAAGTTGTTTA
GCAAAACCTCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTTTAGATCGTTACGCTAACTATG
AGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTGGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTTACGGTACATGGGTTC
TATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGT
GGCGGTACTAAACCTCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGCACTT
ATCCGCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTTTTCAT
GTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGTGCATTAAGTGTATACGGGCACTGTTACTCAAGGCACCTGAC
CCCGTTAAACTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAATTCA
GAGACTGCGCTTTCCATTCTGGCTTTAATGAGGATCCATTGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCC
TCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGT
GGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGCTCCGGTCCGGTGATTTTGATTATGAAA
AAATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAA
ACTTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGT
AATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAA
TGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCTTGCCTCAGTCGGTTGAATGTGCGCCCTTATGTCTTTGGCGCTGGTAA
ACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTATATGTTGCC
ACCTTTATGTATGTATTTTCGACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCT;

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,洗板后加入呈
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。

2. 根据权利要求1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。

3. 根据权利要求1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;

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浓度100 μ g/mL及卡那霉素浓度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。

4. 根据权利要求1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。

5. 根据权利要求1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 $\sim$ 5 $^{\circ}$ C下静置,8 $\sim$ 12小时后去掉孔内的液体,加入200 μ L 2%脱脂奶粉溶液,20 $\sim$ 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,测定孔内溶液的吸光度,制作标准曲线。

6. 根据权利要求5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
SYSLTISSMEAEDVATYYCFQGSGYPFTFGSGTKLEIKR。

[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
GCTCTCGCCAAAATCGAAGAAGGTAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAGT
CGGTAAGAAATTCGAGAAAGATACCGGAATTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTTCCAC
AGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGC
CTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAA
CGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGCTGCCGAACCCGC
CAAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTG
CAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGA
CATTAAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGTTGACCTGATTA AAAACAAAC
ACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGC
CCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAACGGTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAACC
ATCCAAACCGTTTCGTTGGCGTGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAAGAGTTCC
TCGAAAACCTATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAG
TCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACCATGGAAAACGCCAGAAAGGTGAAATCATGCC
GAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGGTGCTCAGACTG
TCGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAATAACAATAACAACAACCTCGGG
ATCGAGGGAAGGATTTTCAAGATTCGCGTCGACGGAAAAATGTGCTCACCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCC
AGGGGAAAAGGTACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAAACA
CCTCCCCAAACTCTGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTCGCTTCACTGGCAGTGGGTCT
GGAAACTCTTACTCTCTCAGATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTATTACTGTTTTTCAGGGGAGTGG
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] ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGA
GGTGAACCTGGTGAATCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCTGTGCAGCCTCTGGA
TTCACCTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCAACCATT
GTAGTGGTGGTAGTTACACCTTCTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAA
CACCTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGCGATGATTACAAG
GACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCGAGCTCACCGGCGTCGGCCGCACATCATCATC
ACCATCACGGGGCCGCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTTGAAAGTTG
TTTAGCAAAACCTCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAAC
TATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTGGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTTACGGTACATGGG
TTCCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGA
GGGTGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGC
ACTTATCCGCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTT
TCATGTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGTGCATTAAGTGTATACGGGCACTGTTACTCAAGGCAC
TGACCCCGTTAAAACTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGTTACTGGAACGGTAA
TTCAGAGACTGCGCTTTCATTCTGGCTTTAATGAGGATCCATTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACC
TGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGCTCTGA
GGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGCTCCGGTCCGGTGATTTTGATTAT
GAAAAATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAG
GCAAACCTTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGTCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAA
TGGAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCTCAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCT
TTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCTTGCCTCAGTCGGTTGAATGTCGCCCTTATGTCTTTGGCGCTG
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DNAMarker,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] ENVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSNTSPKLWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNS
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] ATGAAATAAAACAGGTGCACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAACGACGATGATGTTTTCCGCCTC
GGCTCTCGCCAAAATCGAAGAAGGTAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAA
GTCGGTAAGAAATTCGAGAAAAGATACCGAATTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTCC
CACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATC
TGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGT
TACAACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTATAACAAAGATCTGCTGCCGA
ACCCGCCAAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTT
CAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGC
AAGTACGACATTAAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGTTGACCTGATTA
AAAACAAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGAC
CATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAACGGTACTGCCGACCTTC
AAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGG
CAAAAGAGTTCTCGAAAACCTATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGC
CGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACCATGGAAAACGCCCAGAAA
GGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCA
GCGGTCTGTCAGACTGTCGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAATAACAA
TAACAACAACCTCGGGATCGAGGGAAGGATTCAGAATTCCGCTCGACGGAAGATGTGCTACCCAGTCTCCAGCA
ATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGT
ACCAGCAGAAGTCAAACACCTCCCCCAAACCTCTGGATTTATGACACATCCAAACCTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTCG
CTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACTCTTACTCTCTCACGATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTAT
TACTGTTTTTCAGGGGAGTGGGTACCCATTACGTTCCGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGTGCGGCCGCAC
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:MKIKTGARILALS
ALTMMFSASALAKIEEGKLVIIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWA
HDFRGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKEL
KAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVNAGAKAGLTFLVDLIKHKHMNADTDYSIAEA
AFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNIGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLE
AVNKDKPLGAVALKSYYEELAKDPRIAATMENAQKEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTN
SSNNNNNNNNNNLGI EGRISEFASTENVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSNTSPKLWIYDT

SKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLSLTSSMEADVATYYCFQGSQYPFTFGSGTKLEIKRAAAHHHHHGAEEQKLISE
EDLNAA;

[0059] 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

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 3、抗体重链可变区与噬菌体pIII蛋白的融合体的构建

[0063] 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;

[0064] 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;

[0065] 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。

[0066] 抗体重链特异引物:

[0067] 正向引物: 5'-GCCGCCATGGCCGAGGTGAACCTGGTGGA-3' ;

[0068] 反向引物: 5'-TGAGCTCGAGACTGTGAGAGTGGT-3' ;

[0069] 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DNAMarker, 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。

[0070] 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。

[0071] 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。

[0072] 重链可变区的氨基酸序列为：

[0073] EVNLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTFYPDSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCASDDYKDYFDYWGQGTTLTV；

[0074] 抗体重链可变区与噬菌体pIII蛋白的融合体的基因序列为：

[0075] ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGA
GGTGAACCTGGTGGAATCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA
TTCACCTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCCGAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATT
GTAGTGGTGGTAGTTACACCTTCTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAA
CACCTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGCGATGATTACAAG
GACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCGAGCTCACCGGCGTCGGCCGCACATCATCATC
ACCATCACGGGGCCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTTGAAAGTTG
TTTAGCAAAACCTCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTTTAGATCGTTACGCTAAC
TATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTGGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTTACGGTACATGGG
TTCCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGA
GGGTGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGC
ACTTATCCGCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTT
TCATGTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGTGCATTAAGTGTATACGGGCACTGTTACTCAAGGCAC
TGACCCCGTTAAAACTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAA
TTCAGAGACTGCGCTTTCATTCTGGCTTAAATGAGGATCCATTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACC
TGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGCTCTGA
GGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGCTCCGGTCCGGTGATTTTGATTAT
GAAAAAATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAG
GCAAACCTTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGTCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAA
TGGAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCT
TTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCTTTGCTCAGTCGGTTGAATGTCGCCCTTATGTCTTTGGCGCTG
GTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGT
TGCCACCTTTATGTATGATTTTTCGACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCT；

[0076] 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：

[0077] MKYLLPTAAAGLLLLAAQPMAAEVNLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLE
WVATISSGGSYTFYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCASDDYKDYFDYWGQGTTLTVSSSPAS
AAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNATGVVCTGDETQ
CYGTWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNPANPNPSLEES
QPLNTFMFQNNRFRNRQALTVYTGTVTQGTDPVKTYTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQ
GQSSDLPQPPVNAGGSGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGGDFDYKMANANKGAMTENADENAL
QSDAKGKLDSVATDYGAAIDGFIGDVSLANGNGATGDFAGSNSQMAQVGDGDN SPLMNNFRQYLP SLPQSVECRP
YVFGAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFMYVFSTFANILRNKES。

[0078] 4、检测盐酸克伦特罗浓度

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 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。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 山东宽和正生物医药有限公司
[0003]	<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
[0004]	<140> 2018115970371
[0005]	<141> 2018-12-26
[0006]	<160> 6
[0007]	<170> SIPOSequenceListing 1.0
[0008]	<210> 1
[0009]	<211> 116
[0010]	<212> PRT
[0011]	<213> 小鼠 (Mus musculus)
[0012]	<400> 1
[0013]	Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0014]	1 5 10 15
[0015]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0016]	20 25 30
[0017]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
[0018]	35 40 45
[0019]	Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val
[0020]	50 55 60
[0021]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
[0022]	65 70 75 80
[0023]	Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[0024]	85 90 95
[0025]	Ala Ser Asp Asp Tyr Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0026]	100 105 110
[0027]	Thr Leu Thr Val
[0028]	115
[0029]	<210> 2
[0030]	<211> 107
[0031]	<212> PRT
[0032]	<213> 小鼠 (Mus musculus)
[0033]	<400> 2
[0034]	Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
[0035]	1 5 10 15
[0036]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0037]	20 25 30
[0038]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Asn Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
[0039]	35 40 45
[0040]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
[0041]	50 55 60

[0042]	Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu	
[0043]	65	70 75 80
[0044]	Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr	
[0045]	85	90 95
[0046]	Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	
[0047]	100	105
[0048]	<210> 3	
[0049]	<211> 1656	
[0050]	<212> DNA	
[0051]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0052]	<400> 3	
[0053]	atgaaaataa aaacaggtgc acgcatcctc gcattatccg cattaacgac gatgatgttt	60
[0054]	tccgcctcgg ctctcgccaa aatcgaagaa ggtaaactgg taatctggat taacggcgat	120
[0055]	aaaggctata acggtctcgc tgaagtcggt aagaaattcg agaaagatac cggaattaaa	180
[0056]	gtcaccgttg agcatccgga taaactggaa gagaaattcc cacaggttgc ggcaactggc	240
[0057]	gatggccctg acattatctt ctgggcacac gaccgctttg gtggctacgc tcaatctggc	300
[0058]	ctgttgctg aaatcacccc ggacaaagcg ttccaggaca agctgtatcc gtttacctgg	360
[0059]	gatgccgtac gttacaacgg caagctgatt gcttaccgga tcgctgttga agcgttatcg	420
[0060]	ctgatttata acaaagatct gctgccgaac ccgcaaaaaa cctgggaaga gatcccgcg	480
[0061]	ctggataaag aactgaaagc gaaaggtaag agcgcgctga tgttcaacct gcaagaaccg	540
[0062]	tacttcacct ggccgctgat tgctgctgac gggggttatg cgttcaagta tgaaaacggc	600
[0063]	aagtacgaca ttaaagacgt gggcgtggat aacgctggcg cgaaagcggg tctgaccttc	660
[0064]	ctgggtgacc tgattaaaaa caaacacatg aatgcagaca ccgattactc catcgagaa	720
[0065]	gctgccttta ataaaggcga aacagcgtg accatcaacg gcccgtaggc atggtccaac	780
[0066]	atcgacacca gcaaagtga ttatggtgta acggtactgc cgaccttcaa gggtaacca	840
[0067]	tccaaaccgt tcgttgccgt gctgagcgca ggtattaacg ccgccagtcc gaacaaagag	900
[0068]	ctggcaaaag agttcctcga aaactatctg ctgactgatg aaggtctgga agcggttaat	960
[0069]	aaagacaaac cgctgggtgc cgtagcgtg aagtcttacg aggaagagtt ggcgaaagat	1020
[0070]	ccacgtattg ccgccaccat ggaaaacgcc cagaaagggt aaatcatgcc gaacatcccg	1080
[0071]	cagatgtccg ctttctggta tgccgtgcgt actgcggtga tcaacgccgc cagcggtcgt	1140
[0072]	cagactgtcg atgaagccct gaaagacgag cagactaatt cgagctcgaa caacaacaac	1200
[0073]	aataacaata acaacaacct cgggatcgag ggaaggattt cagaattcgc gtcgacggaa	1260
[0074]	aatgtgctca ccagtcctcc agcaatcatg tctgcatctc caggggaaaa ggtaaccatg	1320
[0075]	acctgcagtg ccagctcaag tgtaagtac atgcactggt accagcagaa gtcaaacacc	1380
[0076]	tccccaaaac tctggattta tgacacatcc aaactggctt ctggagtccc aggtcgttc	1440
[0077]	agtggcagtg ggtctgaaa ctcttactct ctcacgatca gcagcatgga ggctgaagat	1500
[0078]	gttgccactt attactgttt tcaggggagt gggtaccatc tcacgttcgg ctcggggaca	1560
[0079]	aagttgaaa taaaacgtgc ggccgcacat catcatcacc atcacggggc cgcagaacaa	1620
[0080]	aaactcatct cagaagagga tctgaatggg gccgca	1656
[0081]	<210> 4	
[0082]	<211> 1722	
[0083]	<212> DNA	

[0084]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0085]	<400> 4
[0086]	atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60
[0087]	atggccgagg tgaacctggt ggaatctggg ggaggcttag tgaagcctgg agggtcacctg 120
[0088]	aaactctcct gtgcagcctc tggattcact ttcagtagct atgccatgtc ttgggttcgc 180
[0089]	cagactccgg agaagaggct ggagtgggtc gcaaccatta gtagtggtgg tagttacacc 240
[0090]	ttctatccag acagtgtgaa ggggcgattc accatctcca gagacaatgc caagaacacc 300
[0091]	ctgtacctgc aaatgagcag tctgaggtct gaggacacgg ccatgtatta ctgtgcaagc 360
[0092]	gatgattaca aggactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcgagc 420
[0093]	tcaccggcgt cggccgcaca tcatcatcac catcacgggg ccgcagaaca aaaactcatc 480
[0094]	tcagaagagg atctgaatgg ggccgcatag actgttgaat gttgttttagc aaaacctcat 540
[0095]	acagaaaatt catttactaa cgtctggaaa gacgacaaaa ctttagatcg ttacgctaac 600
[0096]	tatgagggct gtctgtggaa tgctacaggc gttgtgtgtt gtactggtga cgaaactcag 660
[0097]	tgttacggta catgggttcc tattgggctt gctatccctg aaaatgaggg tgggtggctct 720
[0098]	gagggtggcg gttctgaggg tggcggttct gagggtggcg gtactaaacc tcctgagtac 780
[0099]	ggtgatacac ctattccggg ctatacttat atcaaccctc tcgacggcac ttatccgcct 840
[0100]	ggtactgagc aaaacccgc taatcctaata ctttctcttg aggagtctca gcctcttaat 900
[0101]	actttcatgt ttcagaataa taggttccga aataggcagg gtgcattaac tgtttatacg 960
[0102]	ggcactgtta ctcaaggcac tgaccccggt aaaacttatt accagtacac tcctgtatca 1020
[0103]	tcaaaagcca tgtatgacgc ttactggaac ggtaaattca gagactgcgc ttccattct 1080
[0104]	ggctttaatg aggatccatt cgtttgtgaa tatcaaggcc aatcgtctga cctgcctcaa 1140
[0105]	cctcctgtca atgctggcgg cggctctggt ggtggttctg gtggcggctc tgagggtggc 1200
[0106]	ggctctgagg gtggcggttc tgagggtggc ggctctgagg gtggcggttc cgggtggcggc 1260
[0107]	tccggttccg gtgattttga ttatgaaaaa atggcaaacg ctaataaggg ggctatgacc 1320
[0108]	gaaaatgccg atgaaaacgc gctacagtct gacgctaaag gcaaacttga ttctgtcgct 1380
[0109]	actgattacg gtgctgctat cgatggtttc attggtgacg tttccggcct tgctaattgt 1440
[0110]	aatggtgcta ctggtgattt tgctggctct aattcccaa tggctcaagt cggtgacggt 1500
[0111]	gataattcac ctttaatgaa taatttccgt caatatttac cttctttgcc tcagtcggtt 1560
[0112]	gaatgtgcc cttatgtctt tggcgtggt aaaccatatg aattttctat tgattgtgac 1620
[0113]	aaaataaact tattccgtgg tgtctttgcg tttcttttat atgttgccac ctttatgtat 1680
[0114]	gtattttcga cgtttgctaa catactgcgt aataaggagt ct 1722
[0115]	<210> 5
[0116]	<211> 552
[0117]	<212> PRT
[0118]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0119]	<400> 5
[0120]	Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr
[0121]	1 5 10 15
[0122]	Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala Lys Ile Glu Glu Gly Lys
[0123]	20 25 30
[0124]	Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu
[0125]	35 40 45

[0126]	Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu
[0127]	50 55 60
[0128]	His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly
[0129]	65 70 75 80
[0130]	Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr
[0131]	85 90 95
[0132]	Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln
[0133]	100 105 110
[0134]	Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys
[0135]	115 120 125
[0136]	Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn
[0137]	130 135 140
[0138]	Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala
[0139]	145 150 155 160
[0140]	Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn
[0141]	165 170 175
[0142]	Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly
[0143]	180 185 190
[0144]	Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly
[0145]	195 200 205
[0146]	Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu
[0147]	210 215 220
[0148]	Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu
[0149]	225 230 235 240
[0150]	Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp
[0151]	245 250 255
[0152]	Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val
[0153]	260 265 270
[0154]	Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu
[0155]	275 280 285
[0156]	Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu
[0157]	290 295 300
[0158]	Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn
[0159]	305 310 315 320
[0160]	Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu
[0161]	325 330 335
[0162]	Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys
[0163]	340 345 350
[0164]	Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala
[0165]	355 360 365
[0166]	Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp
[0167]	370 375 380

[0168]	Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn
[0169]	385 390 395 400
[0170]	Asn Asn Asn Asn Asn Asn Leu Gly Ile Glu Gly Arg Ile Ser Glu Phe
[0171]	405 410 415
[0172]	Ala Ser Thr Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala
[0173]	420 425 430
[0174]	Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
[0175]	435 440 445
[0176]	Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Asn Thr Ser Pro Lys Leu
[0177]	450 455 460
[0178]	Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe
[0179]	465 470 475 480
[0180]	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met
[0181]	485 490 495
[0182]	Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr
[0183]	500 505 510
[0184]	Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala
[0185]	515 520 525
[0186]	Ala His His His His His His Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser
[0187]	530 535 540
[0188]	Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
[0189]	545 550
[0190]	<210> 6
[0191]	<211> 574
[0192]	<212> PRT
[0193]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0194]	<400> 6
[0195]	Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
[0196]	1 5 10 15
[0197]	Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
[0198]	20 25 30
[0199]	Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
[0200]	35 40 45
[0201]	Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu
[0202]	50 55 60
[0203]	Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr
[0204]	65 70 75 80
[0205]	Phe Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
[0206]	85 90 95
[0207]	Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
[0208]	100 105 110
[0209]	Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Asp Asp Tyr Lys Asp Tyr Phe Asp

[0210]	115	120	125
[0211]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ser Pro Ala Ser		
[0212]	130	135	140
[0213]	Ala Ala His His His His His His Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile		
[0214]	145	150	155
[0215]	Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu		
[0216]	165	170	175
[0217]	Ala Lys Pro His Thr Glu Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp		
[0218]	180	185	190
[0219]	Lys Thr Leu Asp Arg Tyr Ala Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala		
[0220]	195	200	205
[0221]	Thr Gly Val Val Val Cys Thr Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr		
[0222]	210	215	220
[0223]	Trp Val Pro Ile Gly Leu Ala Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly Gly Ser		
[0224]	225	230	235
[0225]	Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys		
[0226]	245	250	255
[0227]	Pro Pro Glu Tyr Gly Asp Thr Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn		
[0228]	260	265	270
[0229]	Pro Leu Asp Gly Thr Tyr Pro Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn		
[0230]	275	280	285
[0231]	Pro Asn Pro Ser Leu Glu Glu Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe		
[0232]	290	295	300
[0233]	Gln Asn Asn Arg Phe Arg Asn Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr		
[0234]	305	310	315
[0235]	Gly Thr Val Thr Gln Gly Thr Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr		
[0236]	325	330	335
[0237]	Thr Pro Val Ser Ser Lys Ala Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys		
[0238]	340	345	350
[0239]	Phe Arg Asp Cys Ala Phe His Ser Gly Phe Asn Glu Asp Pro Phe Val		
[0240]	355	360	365
[0241]	Cys Glu Tyr Gln Gly Gln Ser Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn		
[0242]	370	375	380
[0243]	Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly		
[0244]	385	390	395
[0245]	Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly		
[0246]	405	410	415
[0247]	Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe Asp Tyr Glu Lys Met Ala		
[0248]	420	425	430
[0249]	Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu		
[0250]	435	440	445
[0251]	Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly		

[0252]	450	455	460
[0253]	Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly		
[0254]	465	470	475 480
[0255]	Asn Gly Ala Thr Gly Asp Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln		
[0256]	485	490	495
[0257]	Val Gly Asp Gly Asp Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr		
[0258]	500	505	510
[0259]	Leu Pro Ser Leu Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Tyr Val Phe Gly		
[0260]	515	520	525
[0261]	Ala Gly Lys Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu		
[0262]	530	535	540
[0263]	Phe Arg Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr		
[0264]	545	550	555 560
[0265]	Val Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser		
[0266]	565	570	

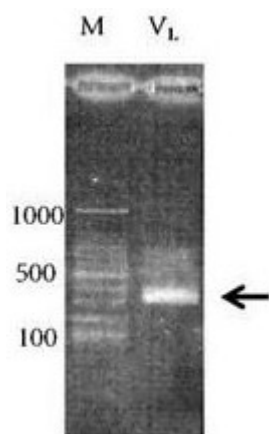


图1

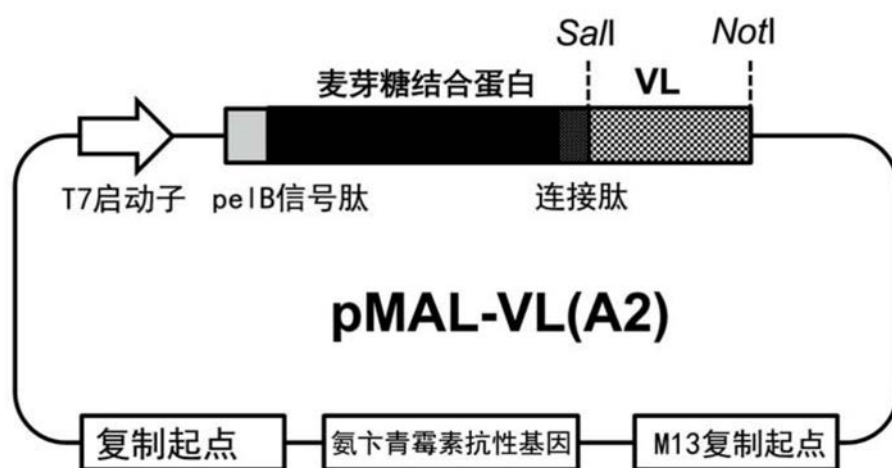


图2

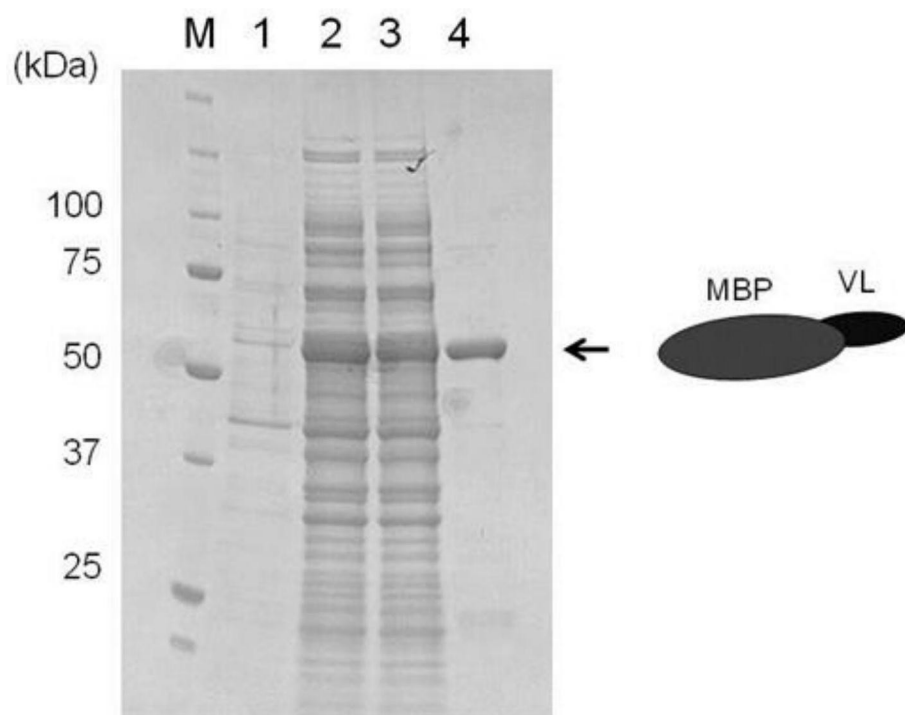


图3

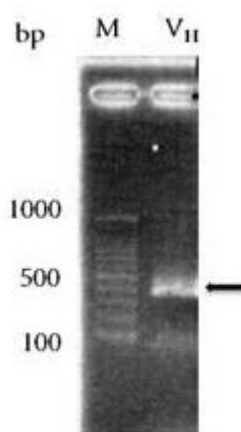


图4

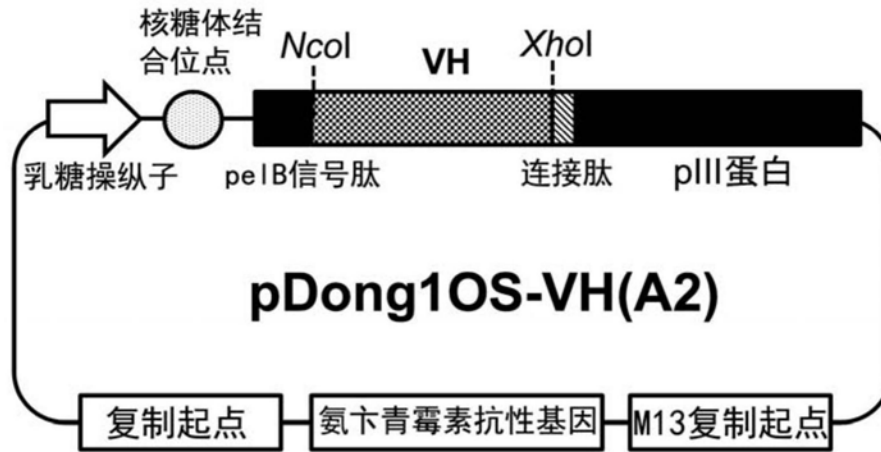


图5

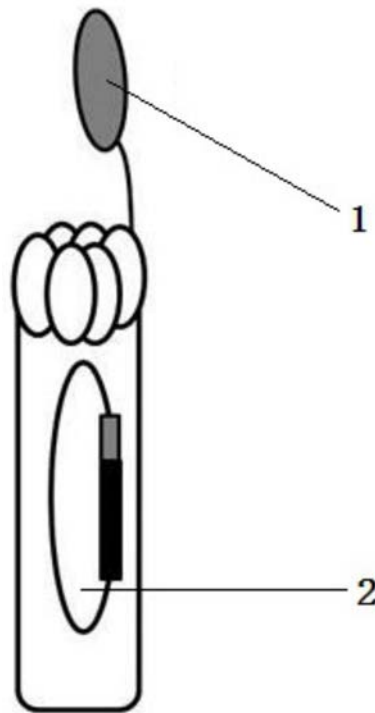


图6

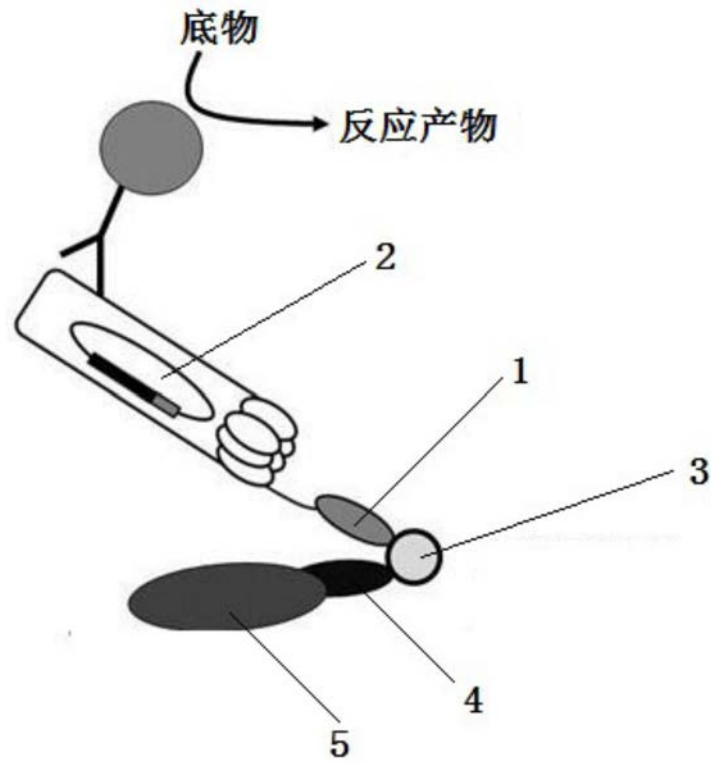


图7

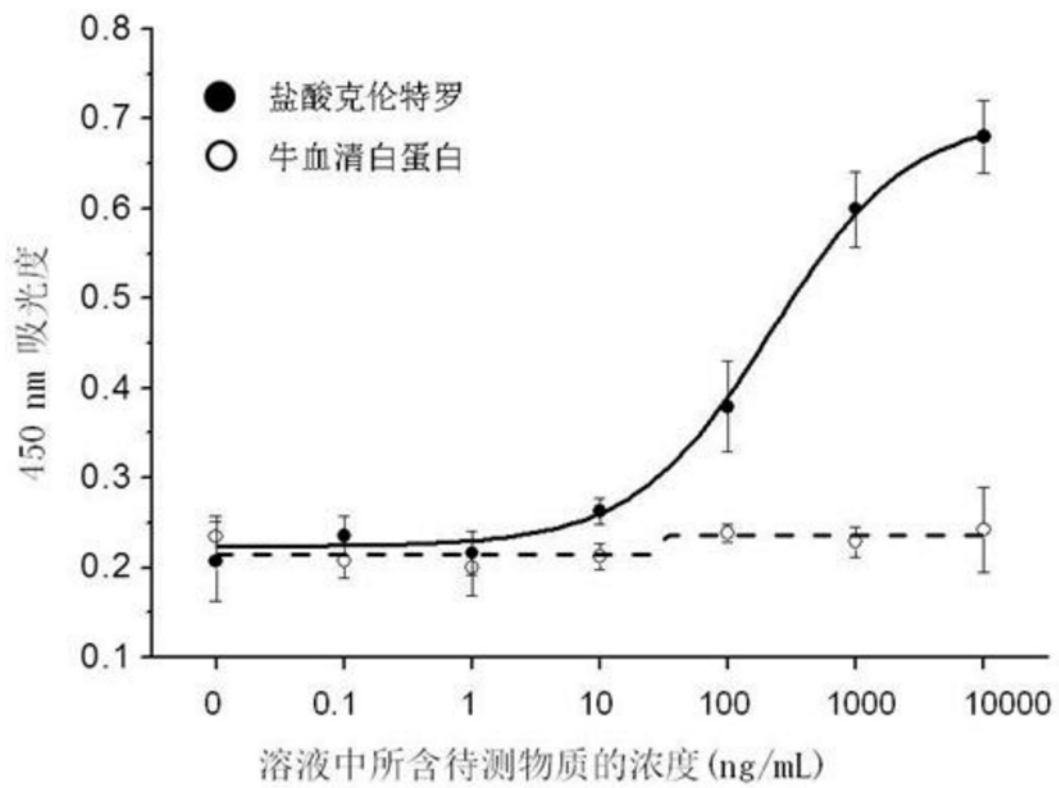


图8