

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2015 年 7 月 30 日 (30.07.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/109953 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/13 (2006.01) A01N 47/44 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) A01P 7/04 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/070422
- (22) 国际申请日: 2015 年 1 月 9 日 (09.01.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201410037240.9 2014 年 1 月 26 日 (26.01.2014) CN
- (71) 申请人: 江苏省农业科学院 (JIANGSU ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国江苏省南京市玄武区钟灵街 50 号食品质量与安全检测研究所, Jiangsu 210014 (CN)。
- (72) 发明人: 刘贤金 (LIU, Xianjin); 中国江苏省南京市玄武区钟灵街 50 号江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所, Jiangsu 210014 (CN)。徐重新 (XU, Chongxin); 中国江苏省南京市玄武区钟灵街 50 号江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所, Jiangsu 210014 (CN)。

所, Jiangsu 210014 (CN)。张霄 (ZHANG, Xiao); 中国江苏省南京市玄武区钟灵街 50 号江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所, Jiangsu 210014 (CN)。刘媛 (LIU, Yuan); 中国江苏省南京市玄武区钟灵街 50 号江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所, Jiangsu 210014 (CN)。谢雅晶 (XIE, Yajing); 中国江苏省南京市玄武区钟灵街 50 号江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所, Jiangsu 210014 (CN)。张存政 (ZHANG, Cunzheng); 中国江苏省南京市玄武区钟灵街 50 号江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所, Jiangsu 210014 (CN)。余向阳 (YU, Xiangyang); 中国江苏省南京市玄武区钟灵街 50 号江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所, Jiangsu 210014 (CN)。王冬兰 (WANG, Donglan); 中国江苏省南京市玄武区钟灵街 50 号江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所, Jiangsu 210014 (CN)。

- (74) 代理人: 江苏圣典律师事务所 (JIANGSU SUNDAY LAW FIRM); 中国江苏省南京市建邺区南湖路 58 号 10 楼, Jiangsu 210017 (CN)。

[见续页]

(54) Title: ANTHROPOGENIC INSECT-RESISTANT GENE AND CRY1C TOXIN IDIOTYPE SINGLE-CHAIN ANTIBODY ENCODED THEREBY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种人源抗虫基因及其编码的抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体与应用

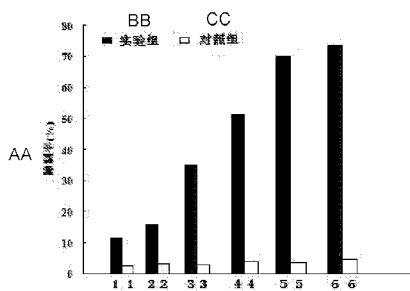


图 1 / Fig.1

AA Inhibition rate (%)
BB Experimental group
CC Control group

(57) Abstract: An anthropogenic insect-resistant gene having a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO.1, and a Cry1C toxin idiotypic single-chain antibody encoded by said anthropogenic insect-resistant gene and having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO.2; the antibody is a β -type and has insecticidal activity, and after expression by the prokaryotic system, the primary culture thereof has binding activity to Cnaphalocrocis medinalis midgut peritrophic membrane specific receptor BBMV; the β -type Cry1C toxin idiotypic single-chain antibody of the present invention is obtained without animal immunisation, has a short preparation period and small amino acid sequence, and is suitable for large-scale in vitro production. The present invention is an entirely new insect-resistant gene resource, and has significant implications for decreasing the various safety risks associated with the widescale use of existing Bt toxins, substituting Bt toxins in the biocontrol of agricultural pests, and reducing the use of pesticides.

(57) 摘要:

[见续页]



WO 2015/109953 A1



(81) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚

(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

一种核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的人源抗虫基因, 以及由该人源抗虫基因编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO.2 的抗 CryIC 毒素独特型单链抗体; 该抗体为"β"类型, 具有杀虫活性, 经原核系统表达后, 其初级培养物具有与稻纵卷叶螟中肠围食膜特异性受体 BBMV 的结合活性; 本发明不经动物免疫而获得"β"类型的 CryIC 毒素独特型单链抗体, 制备周期短, 氨基酸序列小, 适合体外大规模生产, 同时, 本发明作为全新的新抗虫基因资源, 对降低现有 Bt 毒素广泛使用存在的各类安全风险、替代 Bt 毒素用于农业害虫的生物防治、减少杀虫剂的使用具有重要意义。

一种人源抗虫基因及其编码的抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体与应用

技术领域

本发明涉及基因工程和生物防治领域，特别是一种人源抗虫基因及其编码的抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体与应用。

背景技术

目前全球广泛用于生物防治病虫害的杀虫基因是苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 的 Bt 毒素基因 (例如 Cry1C、Cry1Ab、Cry1B、Cry1F 等)。苏云金芽孢杆菌是一种昆虫性病原细菌，其产生的 Bt 毒素对多种农、林害虫都具有特异性毒杀作用。到 1987 年比利时植物遗传系统公司 (Plant Genetic Systems) 就在世界上首次报道了转 *Bt* 基因抗虫烟草获得成功，到现在，*Bt* 基因已经被转到玉米、水稻、棉花、番茄、马铃薯、烟草等世界主要农作物中。据 2012 年国际生物技术应用服务组织统计，中国种植的转 *Bt* 棉面积就已经超过 390 万公顷，占棉花种植总面积的 71.5 %。然而，随着转 *Bt* 基因作物的应用和推广，其在基因逃逸、改变土壤微生物生态结构、物种的耐药性以及危害正常免疫系统等方面可能存在的潜在危害备受社会关注。“转 Bt 基因玉米根际微生物和细菌生理群多样性” (王敏等，生态学杂志，2010 年 03 期) 和“转 Bt 基因玉米对土壤细菌数量多样性的影响” (刘玲等，生态与农村环境学报，2011 年 03 期) 分别对室内、室外种植转 Bt 玉米的土壤进行了细菌数量和多样性分析，结果都发现种植转 Bt 玉米的与空白对照组相比出现显著差异。

“Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine” (Vázquez-Padrón 等，Biochem Biophys Res Commun, 2000 年 01 期) 在动物试验发现，当小鼠摄取的 Bt 内、外毒蛋白达到 10 mg/kg 和 100 mg/kg 时，小鼠的 T 细胞 ANAE 阳性率、脾脏指数及巨噬细胞的吞噬

功能均出现了明显的抑制反应，随着摄取剂量的增加，这种抑制作用越发明显。试验还发现，当Bt毒素蛋白在动物体内的蓄积系数大于6.24时，可以导致肝脏、肾脏及胃肠道等损伤，在肝脏和肾脏中可以观察到细胞肿胀和空泡样变性异象，并且能看见肾小球血管上皮细胞的病变，当然这也不能排除是由免疫反应造成的。长期大剂量使用Bt毒素蛋白，还会导致动物白细胞总数和血红蛋白含量显著性下降，这也说明Bt毒素蛋白具有明显的免疫抑制毒性。开拓具有Bt毒素生物活性的替代生物效应物（例如：抗独特型抗体）是开发生物农药领域研究的热点。

1974年，丹麦免疫学家 Jerne 在其“免疫网络学说(Immune Network Theory)”中首次提出抗独特型抗体的概念。抗独特型抗体(Anti-idiotypic antibody，以下简称 Anti-Id)是指针对位于抗体分子可变区的独特型(Idiotypic, Id)产生的特异性抗体。Bona 等根据 Id 与 Anti-Id 的血清学反应以及 AId 的功能，将抗独特型抗体分为 4 种类型(α ， β ， γ 和 ϵ)。 β 型抗独特型抗体由于具有“内影像”作用，即具有与(半)抗原相同的抗原决定簇，因而可以具有抗原的功能和生物活性。

目前普遍认为采用噬菌体展示技术，通过构建噬菌体抗体库，经特异性筛选，可以获得具有靶标抗原类似效应的抗独特型抗体。采用噬菌体展示技术筛选特异性抗体的过程称为“淘选(Panning)”，主要包括结合、洗涤、洗脱和扩增 4 个步骤。Raats 等采用抗皮质醇单克隆抗包被做为固相抗原直接进行筛选，在进行筛选之前，用相同种属的阴性单克隆抗体进行负筛选以避免筛选到与抗体恒定区结合的重组抗体片段，最终成功筛选到针对皮质醇的 Anti-Id。Goletz 等同样利用噬菌体抗体展示系统并研究比较了不同洗脱方法对抗独特型抗体片段筛选结果的影响，最终筛选到的 96 个克隆中有 28 个为具有抗独特型特性的阳性克隆。目前针对可替代 Bt 活性效应物，特别是抗 Bt 毒素类型的抗独特型单链抗体（以下简称 Anti-Id ScFvs）小分子多肽等相关材料及产品还未见报道。

发明内容

针对目前转 Bt 毒素作物及其毒素制剂的广泛应用存在的安全隐患及超敏反应

等问题，开拓具有 Bt 毒素生物活性的可替代生物效应物及其在生物防治害虫中的应用，本发明是这样实现的：

一种人源抗虫基因，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

本发明中，由 SEQ ID NO.1 编码的抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

本发明中，一种含有人源抗虫基因 SEQ ID NO.1 的原核表达载体。

本发明中，一种人源抗虫基因 SEQ ID NO.1 在农业害虫防治方面的应用。

本发明中，一种含氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示的抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体的杀虫剂。

本发明从公开的人类基因库中，筛选获得 1 种具有杀虫活性的“ β ”类型抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体，该单链抗体经原核系统表达，其初级培养物具有与稻纵卷叶螟中肠围食膜特异性受体 BBMV 的结合活性，本发明不经动物免疫而获得“ β ”类型的抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体，制备周期短，氨基酸序列小，适合体外大规模生产；同时，本发明作为全新的新抗虫基因资源，对探索拓展具有模拟 Bt 毒素生物活性的新型抗虫基因资源，降低现有 Bt 毒素广泛使用存在的各类安全风险乃至以后可能替代 Bt 用于农业害虫的生物防治，减少杀虫剂的使用等具有重要的科学及现实意义。

附图说明

图 1 为 E8 ELISA 检测结果示意图。

图 2 为 E8 生物学测定结果示意图。

图 3 为分别喂食经 E8、CK+、CK-浸泡过的水稻叶片后的稻纵卷叶螟三龄幼虫死亡情况示意图。

图 4 为分别喂食经 E8、CK+、CK-浸泡过的甘蓝片后的小菜蛾三龄幼虫死亡情

况示意图。

具体实施方式

实施例 1 筛选人源抗虫基因

实施例所涉及的试剂和培养基配方：

(1) 2×TY 液体培养基：

在900 mL双蒸水中加入16 g胰蛋白胨，10 g酵母提取物和5 g NaCl，搅拌均匀，用双蒸水定容到1 L，置于高压灭菌锅中，121℃，20min灭菌，冷却后，置于4℃保存备用。

(2) 2×TY-AG液体培养基：

在 2×TY 的培养基中加入终浓度为 100 μg/ml 氨苄青霉素和质量比为 1 %葡萄糖。

(3) 2×TY-AK 液体培养基：

在 2×TY 的培养基中加入终浓度为 100 μg/ml 氨苄青霉素、50 μg/ml 卡那霉素。

(4) 2×TY-AKG 液体培养基：

在 2×TY 的培养基中加入终浓度为 100 μg/ml 氨苄青霉素、50 μg/ml 卡那霉素和质量比为 1 %葡萄糖。

(5) TYE固体培养基：

在 900 ml 双蒸水中加入 15.0 g 琼脂糖，8 g NaCl，10 g 胰蛋白胨，5 g 酵母提取物，用双蒸水定容到 1 L，置于高压灭菌锅中，121℃，20min 灭菌，冷却后，置于 4℃保存备用。

(6) TYE-AG 固体培养基：

在 TYE 固体培养基中加入终浓度为 100 μg/ml 氨苄青霉素和质量比为 1 %

葡萄糖。

(7) PBS 溶液

称取 NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, KH_2PO_4 0.2 g, 分别加入到蒸馏水中, 充分溶解后, 定容到 1 L。

(8) PBST 溶液

在 PBS 溶液中加入体积比为 0.05% 的吐温-20。

(9) PEG/NaCl 溶液:

称取 20 g PEG 8 000, 14.61 g NaCl, 加 80 ml 去离子水, 定容到 100 ml, 置于高压灭菌锅中, 121℃, 20min 灭菌, 冷却后, 置于 4℃ 保存备用。

(10) 柠檬酸盐缓冲液(CPBS, 底物缓冲液, pH5.5):

取 $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_8$ (柠檬酸) 21 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g, 分别加入到蒸馏水中充分溶解后定容到 1 L。

(11) 四甲基联苯胺(TMB)溶液:

称取 10 mg 四甲基联苯胺溶于 1 ml 二甲基亚砷中, 避光, 置于 4℃ 保存备用。

(12) 底物显色溶液:

10 ml 配方成分: 9.875 ml CPBS、100 μl TMB 溶液、25 μl 体积比为 20% H_2O_2 。

实施例所涉及材料来源:

抗 Cry1C 多克隆抗体、BBMV、不相关的抗独特型单链抗体、非“ β ”类型的 Anti-Id ScFv、甘蓝叶片、小菜蛾三龄幼虫均由江苏省农业科学院农业部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室提供;

人源化的噬菌体抗体库、TG1 细菌和辅助噬菌体 KM13 购于英国 Source

BioScience公司；

HRP-羊抗M13-IgG 购于武汉博士德公司；

Cry1C毒素和Cry1Ab毒素购于上海佑隆生物科技有限公司；

水稻叶片和纵卷叶螟三龄幼虫由扬州绿源生物化工有限公司提供。

实施例1 筛选抗Cry1C毒素独特型单链抗体

(1) 取人源化的噬菌体抗体库菌液20 μ l加入到200 ml 2 $\times$ TY-AG液体培养基中，37 $^{\circ}$ C恒温培养到OD₆₀₀为0.4，取50 ml菌液，加入 1×10^{12} pfu辅助噬菌体KM13进行超感染，于37 $^{\circ}$ C孵育30 min后以3300 g离心10 min,弃上清液，用100 ml 2 $\times$ TY-AG液体培养基重悬沉淀，30 $^{\circ}$ C培养过夜；次日3300 g离心30 min，收集上清液并加入20 ml PEG/NaCl溶液，冰浴1 h后再3300 g离心30 min，用4 ml PBS重悬沉淀；重悬液以11600 g离心10 min，上清液即为扩增的噬菌体抗体库；

(2) 取步骤1获得的扩增的噬菌体抗体库进行4 轮淘筛：第1 轮淘筛将 4 ml 100 μ g /ml的抗Cry1C多克隆抗体包被于细胞培养瓶底部，4 $^{\circ}$ C过夜，次日分别用1 ml PBS清洗细胞培养瓶3 次后加入混匀的1 ml 扩增的噬菌体抗体库与4 ml 3%的MPBS溶液，置于摇床于室温下缓慢摇动1 h，再静置1 h后倾去培养瓶中液体，分别用1 ml PBST溶液洗瓶20次，加入1ml 10mg/ml 的胰蛋白酶(Trypsin) 洗脱特异性结合的噬菌体抗体，洗脱液即为第1 轮淘筛的噬菌体抗体；第2、3、4 轮淘筛的包被抗Cry1C多克隆抗体浓度分别为50 μ g /ml、25 μ g /ml、10 μ g /ml ，所使用的噬菌体抗体为前一轮淘筛获得的噬菌体抗体，淘筛方法与第1 轮相同；取第4 轮淘筛的噬菌体抗体10 μ l侵染1 ml 处于对数生长期的TG1细菌，37 $^{\circ}$ C孵育1 h后，涂布于TYE-AG固体培养基上，37 $^{\circ}$ C培养过夜；次日随机挑取单菌落，接种到含100 μ l/孔 2 $\times$ TY-AG液体培养基的96 孔板中，37 $^{\circ}$ C培养过夜；次日从板孔中吸出2 μ l菌液转接到新的96孔板孔中，37 $^{\circ}$ C孵育2 h，每孔加入25 μ l 滴度

为 10^{12} 的辅助噬菌体 KM13, 30 °C 孵育2 h, 1800 g 离心10 min, 用150 μ l 2 $\times$ TY-AK 液体培养基重悬沉淀后30 °C 培养过夜, 次日1800 g 离心30 min, 分别取上清液;

(3) 取4 μ g/ml的抗Cry1C多克隆抗体加入到96 孔板中, 100 μ l/孔, 4 °C 过夜, 次日每孔分别加入100 μ l步骤2 获得的上清液, 阴性对照加100 μ l 2 $\times$ TY-AK 液体培养基, 37 °C 水浴2 h, 每孔用250 μ l PBST洗板后, 每孔加入100 μ l 1:5000 稀释的HRP-羊抗M13-IgG, 37°C 孵育2 h; 每孔加入100 μ l底物显色溶液, 室温下 反应10~20 min至出现蓝色, 最后每孔加入50 μ l 浓度为2 mol/L的H₂SO₄快速终止 反应后用酶标仪测定OD₄₅₀值, 其中溶液OD₄₅₀值/阴性对照OD₄₅₀值 大于2.1的, 判断为阳性, 与该溶液对应的步骤2中的上清液即为筛选到的含有抗Cry1C毒素 独特型单链抗体的上清液。

以 Sanger 测序法测定筛选到的抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体核苷酸序列为 SEQ ID NO.1 如下:

```
tctatttcaa ggagacagtc ataatgaaat acctattgcc tacggcagcc gctggattgt      60
tattactcgc ggcccagccg gccatggccg aggtgcagct gttggagtct gggggaggct      120
tggtagacgc tgggggggtcc ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc acctttagca      180
gctatgccat gagctgggtc cgccaggctc caggaagggt gctggagtgg gtctcatcga      240
ttagtaagca tggtagtagg acaacttacg cagactccgt gaagggccgg ttcaccatct      300
ccagagacaa ttccaagaac acgctgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaggaca      360
cggccgtata ttactgtgctg aaacggagta ggctgtttga ctactggggc caggaacccc      420
tggtcaccgt ctcgagcgggt ggaggcgggt caggcgaggg tggcagcggc ggtggcgggt      480
cgacggacat ccagatgacc cagtctccat cctccctgtc tgcactctgt ggagacagag      540
tcaccatcac ttgccgggca agtcagagca ttagcagcta tttaaattgg tatcagcaga      600
aaccagggaa agcccctaag ctctgatctc atcatgcac ccacttgcaa agtgggggtcc      660
catcaagggt cagtggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc agcagtctgc      720
aacctgaaga ttttgcaact tactactgtc aacagcggca tcagcggcct cggacgttcg      780
gccaagggac caaggtggaa atcaaacggg cggccgcaca tcatcatcac catcacgggg      840
ccg                                                                 843
```

以 Sanger 测序法测定筛选到的抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体核苷酸翻译后的氨基酸序列为 SEQ ID NO.2, 如下:

H-CDR1

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR 60

H-CDR2

--

QAPGKGLEWVSSI/SKHGSRTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK 120
H-CDR1 -----Link-----
 RSRLFDYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS 180
L-CDR1 *L-CDR2*
 QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYHASHLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY 240
L-CDR3 *His-tag*
 YCQQRHQRPRTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAASTP 291

申请人将此抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体自命名为 E8。

实施例 2 制备 E8 的初级培养物

将实施例 1 筛选到的含有抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体的上清液按体积比 1:100 转接到 10 ml 2×TY-AG 液体培养基中，37 °C 孵育 2 h，加入 100 μl 滴度为 10¹² 的辅助噬菌体 KM13 进行救援，30 °C 孵育 2 h，1 800 g 离心 10 min，去上清液，用 2×TY-AK 液体培养基重悬沉淀菌种，于 30 °C、250 rpm 振荡培养过夜；次日 1 800 g 离心 30 min，其上清液即为含有 E8 初级培养物的上清液。

实施例 3 E8 的亚型鉴定

(1) 竞争抑制 ELISA 检测实验

实验分为 6 个实验组与相应的对照组，分别依表 1 配制溶液

表 1 竞争抑制 ELISA 检测实验溶液配制

分组	E8	不相关的抗独特型单链抗体	2×TY 液体培养基
实验组 1	5 μl		45 μl
对照组 1		5 μl	45 μl
实验组 2	10 μl		40 μl
对照组 2		10 μl	40 μl
实验组 3	20μl		30μl
对照组 3		20μl	30μl
实验组 4	30μl		20μl
对照组 4		30μl	20μl
实验组 5	40μl		10μl

对照组 5		40μl	10μl	
实验组 6	50μl			
对照组 6		50μl		

表 1 中 E8 为实施例 2 获得的含 E8 初级培养物的上清液；

分别向表 1 配制好的溶液中加入 50μl 10 μg/ml 的抗 Cry1C 多克隆抗体 37 °C 孵育 2 h，后分别加入到包被有 2 μg/ml Cry1C 毒素的 96 孔板中（所述包被有 2 μg/ml Cry1C 毒素的 96 孔板为前一天取 2 μg /ml 的 Cry1C 毒素加入到 96 孔板中，100 μl/孔，4 °C 过夜）反应 2 h；每孔用 250 μl PBST 洗板 3 次后每孔分别加入 100 μl 1:5000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h；每孔用 250 μl PBST 洗板 3 次后，每孔分别加入 100 μl 底物显色溶液，室温下反应 10~20 min 至出现蓝色，最后每孔分别加入 50 μl 浓度为 2 mol/L 的 H₂SO₄ 快速终止反应；用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。

实验结果如图 1 所示，可见抑制率随着 E8 含量的增加而增大，对照组则无竞争抑制现象，说明 E8 为 β 型抗独特型单链抗体，能够模拟 Cry1C 毒素与其竞争结合抗 Cry1C 毒素多克隆抗体。

（2）生物学测定实验

实验分为实验组 1、实验组 2、实验组 3、阳性对照组、阴性对照组 1、阴性对照组 2、阴性对照组 3；实验步骤如下：

（a）封闭：将 100 μl/孔 5 μg/ml BBMV 包被于 96 孔板中，4 °C 过夜，次日每孔用 250 μl PBST 洗板 3 次后，分别加入 200 μl 质量比为 3 % 的 BSA 于室温孵育 2 h，进行封闭；

（b）加样：将步骤 1 封闭后的 96 孔板 用 250 μl/孔 的 PBST 洗板 3 次 后，分别向 96 孔板按照表 2 进行加样：

表 2 E8 生物学测定实验溶液配制

分组	2μg/ml Cry1C 毒素	E8	非 “ β ” 类型的 Anti-Id ScFv	2×TY-AG 液 体培养基	CPBS
实验组 1	50 μl	10 μl		40μl	

实验组 2	50 μ l	30 μ l		20 μ l	
实验组 3	50 μ l	50 μ l			
阳性对照组	50 μ l				50 μ l
阴性对照组 1	50 μ l		10 μ l	40 μ l	
阴性对照组 2	50 μ l		30 μ l	20 μ l	
阴性对照组 3	50 μ l		50 μ l		

表 2 中，E8 为实施例 2 获得的含 E8 初级培养物的上清液；

(c) 将步骤 b 加样后的 96 孔板于室温下孵育 2 h，每孔用 250 μ l PBST 洗板 3 次后，然后每孔加入 100 μ l 10 μ g/ml 抗 Cry1C 多克隆抗体，再每孔用 250 μ l PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 μ l 1:5000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h；每孔用 250 μ l PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 μ l 底物显色溶液，室温下反应 10~20 min 至出现蓝色，最后每孔加入 50 μ l 浓度为 2 mol/L 的 H₂SO₄ 快速终止反应后，用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。

实验结果如图 2 所示，与阳性对照相比，抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体 E8(实验组 1、2、3) 能够抑制 Cry1C 毒素与其受体 BBMV 结合；而非“ β ”类型的阴性对照则无抑制现象，进一步证实了 E8 为“ β ”类型。

实施例 4 抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体杀虫活性验证

实验分为实验组与对照组：

实验组用实施例 2 获得的含有 E8 初级培养物的上清液 (E8)；

阳性对照组采用浓度为 0.2g/L 的 Cry1Ab 毒素 (CK+)；

阴性对照组采用非“ β ”类型的 Anti-Id ScFvs (CK-)；

实验步骤：

取实验组、阳性对照组、阴性对照组各 10 ml，置于灭菌后的培养皿中，分别放入 6 片水稻叶片和 6 片甘蓝叶片，浸泡 30min，取出晾干；稻纵卷叶螟三龄幼虫和小菜蛾三龄幼虫以晾干后的叶片喂食。

实验结果如图 3、4 所示，其中，图 3 为 分别喂食经 E8、Cry1Ab 毒素(CK+)、

非“ β ”类型的 Anti-Id ScFvs (CK-) 浸泡过的水稻叶片后的稻纵卷叶螟三龄幼虫死亡情况，图 4 为 分别喂食经 E8、Cry1Ab 毒素 (CK+)、非“ β ”类型的 Anti-Id ScFvs (CK-) 浸泡过的甘蓝片后的小菜蛾三龄幼虫死亡情况，可看出，E8 具有较好的杀虫效果。

- 1.一种人源抗虫基因，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。
- 2.一种由权利要求 1 所述人源抗虫基因编码的抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。
- 3.一种含有权利要求 1 所述人源抗虫基因的原核载体。
- 4.一种如权利要求 1 所述人源抗虫基因在农业害虫防治方面的应用。
- 5.一种含权利要求 2 所述抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体的杀虫剂。

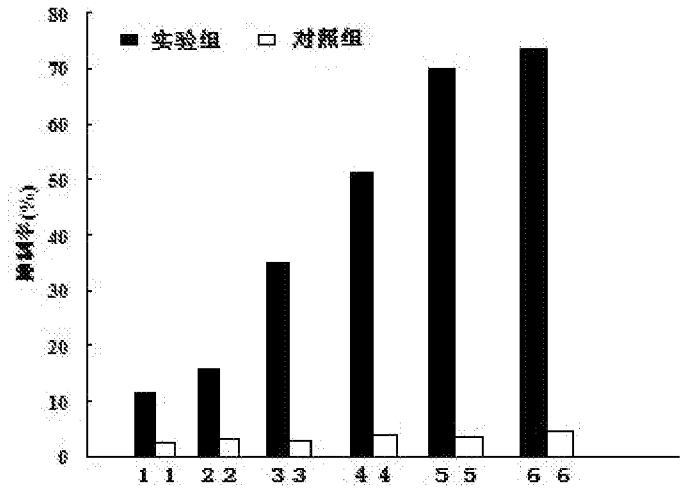


图 1

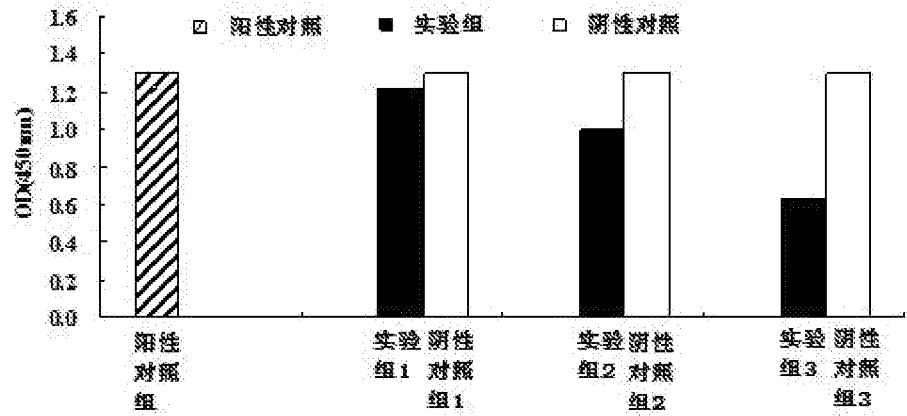


图 2

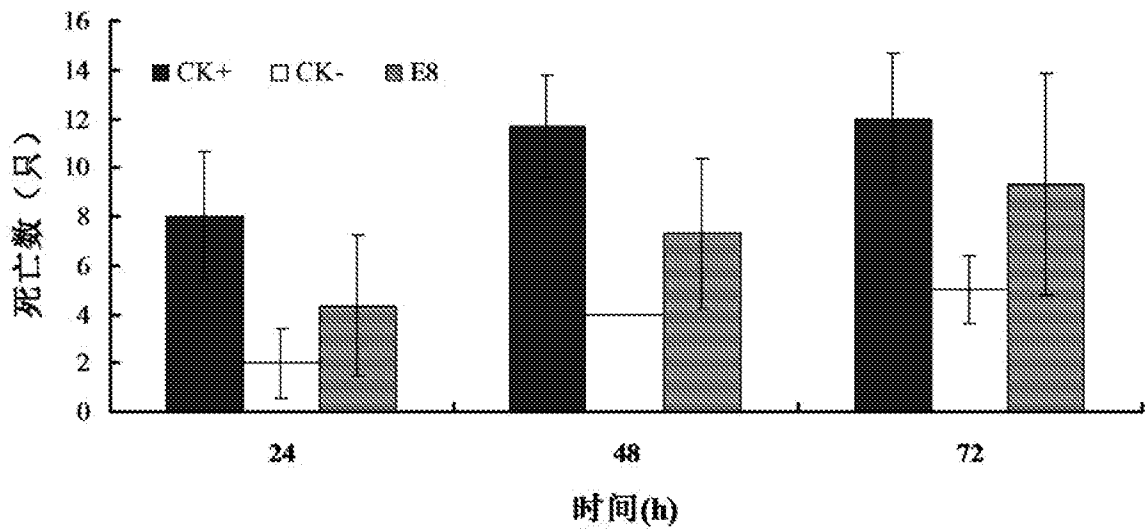


图 3

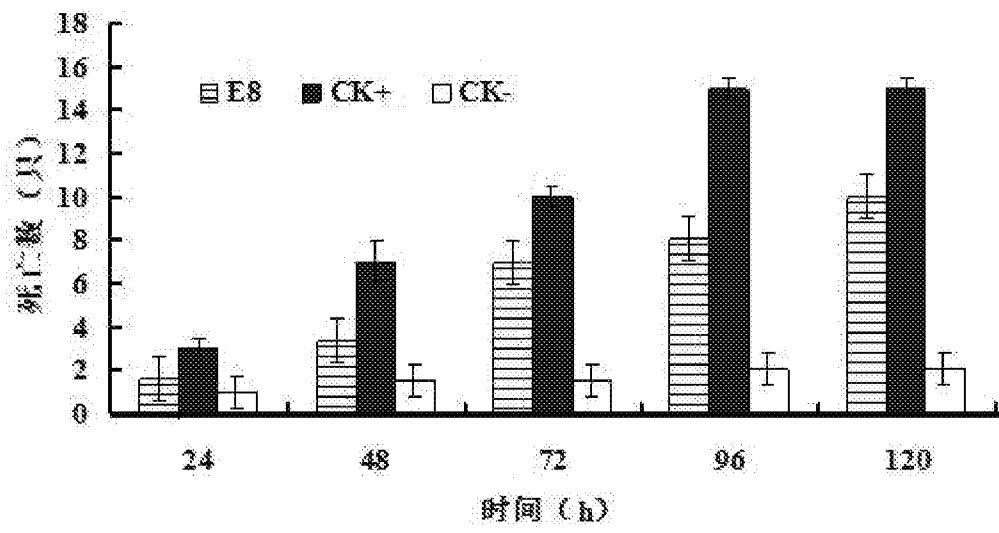


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/070422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/70 (2006.01) i; C07K 16/12 (2006.01) i; A01N 47/44 (2006.01) i; A01P 7/04 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N; C07K; A01N; A01P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI; SIPOABS; EPODOC; CNABS; GENBANK: LIU, Xianjin; XU, Zhongxin; ZHANG, Xiao; LIU, Yuan; XIE, Yajing; ZHANG, Cunzheng; YU, Xiangyang; WANG, Donglan; JIANGSU ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES, human-derived insect-resistant gene, Cry1C, idiotype, single chain antibody, phage, antibody library, Cry??, Bacillus, Bt, toxin, SEQ ID NOs. 1-2, KM13, single chain, single-chain, scFv, specific, antibod+, human, librar+, Screen+, identif+, human synthetic phage displayed human library, affinity panning, anti?id, anti?Cry?? antibody

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG, Yun et al., "Isolation of single chain variable fragment (scFv) specific for Cry1C toxin from human single fold scFv libraries, TOXICON. vol. 60, 05 September 2012 (05.09.2012), pages 1290-1297	1-5
A	CN 102936598 A (JIANGSU ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES), 20 February 2013 (20.02.2013), the whole document	1-5
A	US 2004221334 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC.) 04 November 2004 (04.11.2004), the whole document	1-5
A	WANG, Yun et al., "Screening of anti-Cry1Ac scFv from A phage display antibody library", CHINESE JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 25, no. 12, 31 December 2009 (31.12.2009), pages 1146-1148	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 27 February 2015 (27.02.2015)	Date of mailing of the international search report 16 April 2015 (16.04.2015)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer CHEN, Ying Telephone No.: (86-10) 62413758

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/070422

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 02936598 A	20 February 2013	CN 102936598 B	16 April 2014
US 2004221334 A1	04 November 2004	US 5914318 A	22 June 1999
		US 2005155103 A1	14 July 2005
		AU 5371798 A	22 June 1998
		EP 0942929 A1	22 September 1999
		ZA 9710431 A	10 June 1998
		US 6177615 B1	23 January 2001
		US 2003195336 A1	16 October 2003
		AR 010662 A1	28 June 2000
		BR 9713555 A	25 January 2000
		US 7256017 B2	14 August 2007
		US 6423828 B1	23 July 2002
		AU 745431 B2	21 March 2002
		OA 11258 A	22 July 2003
		CA 2272847 A1	04 June 1998
		IL 130082 D0	29 February 2000
		US 5942664 A	24 August 1999
		ID 23695 A	11 May 2000
		US 2003101482 A1	29 May 2003
		US 6809078 B2	26 October 2004
		JP 2001506490 A	22 May 2001
		US 6033874 A	07 March 2000
		CO 4930292 A1	27 June 2000
		CN 1245502 A	23 February 2000
		TR 9901179 T2	22 November 1999
		US 6313378 B1	06 November 2001
		US 6825006 B2	30 November 2004
		US 6153814 A	28 November 2000
		WO 9823641 A1	04 June 1998

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/070422

A. 主题的分类

C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C07K 16/12(2006.01)i; A01N 47/44(2006.01)i; A01P 7/04(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; C07K; A01N; A01P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI; SIPOABS; EPODOC; CNABS; GENBANK; 刘贤金, 徐重新, 张霄, 刘媛, 谢雅晶, 张存政, 余向阳, 王冬兰, 江苏省农业科学院, 人源抗虫基因, Cry1C, 毒素, 独特型, 单链抗体, 噬菌体, 抗体库, Cry??, Bacillus, Bt, toxin, SEQ ID NO.1-2, KM13, single chain, single-chain, scFv, specific, antibod+, human, librar+, Screen+, identif+, human synthetic phage displayed human library, affinity panning, anti?id, anti?Cry?? antibody

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WANG, Yun等. "Isolation of single chain variable fragment (scFv) specific for Cry1C toxin from human single fold scFv libraries" Toxicon, 第60卷期, 2012年 9月 5日 (2012 - 09 - 05), 第1290-1297页	1-5
A	CN 102936598 A (江苏省农业科学院) 2013年 2月 20日 (2013 - 02 - 20) 全文	1-5
A	US 2004221334 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC.) 2004年 11月 4日 (2004 - 11 - 04) 全文	1-5
A	王耘等. "从噬菌体抗体库中筛选抗Cry1Ac蛋白单链抗体" 细胞与分子免疫学杂志, 第25卷卷, 第12期期, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31), 第1146-1148页	1-5

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2015年 2月 27日

国际检索报告邮寄日期

2015年 4月 16日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

受权官员

陈莹

电话号码 (86-10)62413758

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/070422

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102936598	A	2013年 2月 20日	CN	102936598	B	2014年 4月 16日
US	2004221334	A1	2004年 11月 4日	US	5914318	A	1999年 6月 22日
				US	2005155103	A1	2005年 7月 14日
				AU	5371798	A	1998年 6月 22日
				EP	0942929	A1	1999年 9月 22日
				ZA	9710431	A	1998年 6月 10日
				US	6177615	B1	2001年 1月 23日
				US	2003195336	A1	2003年 10月 16日
				AR	010662	A1	2000年 6月 28日
				BR	9713555	A	2000年 1月 25日
				US	7256017	B2	2007年 8月 14日
				US	6423828	B1	2002年 7月 23日
				AU	745431	B2	2002年 3月 21日
				OA	11258	A	2003年 7月 22日
				CA	2272847	A1	1998年 6月 4日
				IL	130082	D0	2000年 2月 29日
				US	5942664	A	1999年 8月 24日
				ID	23695	A	2000年 5月 11日
				US	2003101482	A1	2003年 5月 29日
				US	6809078	B2	2004年 10月 26日
				JP	2001506490	A	2001年 5月 22日
				US	6033874	A	2000年 3月 7日
				CO	4930292	A1	2000年 6月 27日
				CN	1245502	A	2000年 2月 23日
				TR	9901179	T2	1999年 11月 22日
				US	6313378	B1	2001年 11月 6日
				US	6825006	B2	2004年 11月 30日
				US	6153814	A	2000年 11月 28日
				WO	9823641	A1	1998年 6月 4日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)