(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103773776 B
(45)授权公告日 2015.11.18

(21)申请号 201410037240.9

(22)申请日 2014.01.26

(73)专利权人 江苏省农业科学院
地址 210014 江苏省南京市玄武区钟灵街50号

(72)发明人 刘贤金 徐重新 张霄 刘媛 谢雅晶 张存政 余向阳 王冬兰

(74)专利代理机构 江苏圣典律师事务所 32237
代理人 孙忠浩

(51)Int.Cl.
C12N 15/13(2006.01)
C12N 15/70(2006.01)
C07K 16/12(2006.01)
A01N 47/44(2006.01)
A01P 7/04(2006.01)

(56)对比文件

Yun Wang et al..Isolation of single chain variable fragment (scFv) specific for Cry1C toxin from human single fold scFv libraries.《Toxicon》.2012, 第60卷图2,第2节材料和方法.

王耕.两种Bt毒素单链抗体制备与抗体检测技术研究.《中国优秀博士学位论文全文数据库(电子期刊)农业科技辑》.2013, 正文第46页至第49页.

徐重新 等.人源化抗Cry1B毒素蛋白单链抗体的原核表达及生物学活性测定.《南京农业大学学报》.2012, 第36卷(第3期), 全文.

审查员 赵鹏

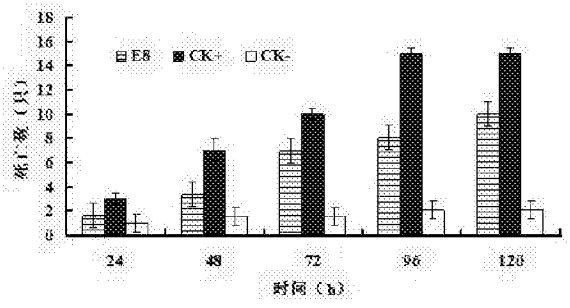
权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图2页

(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

(57)摘要

本发明涉及一种核苷酸序列如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Cry1C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。



CN 103773776 B

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。

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

[0001] 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

[0002] 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、林害虫都有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。

[0003] “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。

[0004] 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-idiotype antibody，以下简称 Anti-Id) 是指针对位于抗体分子可变区的独特型 (Idiotype，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。

[0005] 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

[0006] 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 :

[0007] 一种人源抗虫基因,其核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

[0008] 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。

[0009] 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。

[0010] 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。

[0011] 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。

[0012] 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

[0013] 图 1 为 E8 ELISA 检测结果示意图。

[0014] 图 2 为 E8 生物学测定结果示意图。

[0015] 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。

[0016] 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

[0017] 实施例 1 筛选人源抗虫基因

[0018] 实施例所涉及的试剂和培养基配方 :

[0019] （1）2×TY 液体培养基：

[0020] 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，搅拌混匀，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。

[0021] （2）2×TY-AG液体培养基：

[0022] 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。

[0023] （3）2×TY-AK液体培养基：

[0024] 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。

[0025] （4）2×TY-AKG液体培养基：

[0026] 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。

[0027] （5）TYE固体培养基：

[0028] 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。

[0029] （6）TYE-AG固体培养基：

[0030] 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。

[0031] （7）PBS溶液

[0032] 称取NaCl 8.0 g，KCl 0.2 g，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 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。

[0033] （8）PBST溶液

[0034] 在PBS溶液中加入体积比为0.05%的吐温-20。

[0035] （9）PEG/NaCl溶液：

[0036] 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。

[0037] （10）柠檬酸盐缓冲液（CPBS，底物缓冲液，pH5.5）：

[0038] 取$C_6H_7O_8$（柠檬酸）21 g，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.6 g，分别加入到蒸馏水中充分溶解后定容到1 L。

[0039] （11）四甲基联苯胺（TMB）溶液：

[0040] 称取10 mg四甲基联苯胺溶于1 ml二甲基亚砜中，避光，置于4 ℃保存备用。

[0041] （12）底物显色溶液：

[0042] 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。

[0043] 实施例所涉及材料来源：

[0044] 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；

[0045] 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；

[0046] HRP-羊抗M13-IgG 购于武汉博士德公司；

[0047] Cry1C毒素和Cry1Ab毒素购于上海佑隆生物科技有限公司；

[0048] 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。

[0049] 实施例1 筛选抗Cry1C毒素独特型单链抗体

[0050] (1)取人源化的噬菌体抗体库菌液20 μl加入到200 ml 2×TY-AG液体培养基中,37 ℃恒温培养到OD_{600}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 ℃孵育30 min后以3300 g离心10 min,弃上清液,用100 ml 2×TY-AKG液体培养基重悬沉淀,30 ℃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；

[0051] (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 μg /ml的抗Cry1C多克隆抗体包被于细胞培养瓶底部,4 ℃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 μg /ml、25μg /ml、10 μg /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 μl侵染1 ml 处于对数生长期的TG1细菌,37 ℃孵育1 h后,涂布于TYE-AG固体培养基上,37 ℃培养过夜;次日随机挑取单菌落,接种到含100μl/孔 2×TY-AG液体培养基的96 孔板中,37 ℃培养过夜;次日从板孔中吸出2 μl菌液转接到新的96孔板孔中,37 ℃孵育2 h,每孔加入25 μl 滴度为10^{12}的辅助噬菌体 KM13,30 ℃孵育2 h,1800 g离心10 min,用150 μl 2×TY-AK液体培养基重悬沉淀后30 ℃培养过夜,次日1800 g离心30 min,分别取上清液；

[0052] (3)取4 μg /ml的抗Cry1C多克隆抗体加入到96 孔板中,100 μl/孔,4 ℃过夜,次日每孔分别加入100 μl步骤2 获得的上清液,阴性对照加100 μl 2×TY-AK液体培养基,37 ℃水浴2 h,每孔用250 μl PBST洗板后,每孔加入100 μl 1:5000稀释的HRP-羊抗M13-IgG,37℃孵育2 h;每孔加入100 μl底物显色溶液,室温下反应10~20 min至出现蓝色,最后每孔加入50 μl 浓度为2 mol/L的H_2SO_4快速终止反应后用酶标仪测定OD_{450}值,其中溶液OD_{450}值/阴性对照OD_{450}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。

[0053] 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：

[0054] tctatttcaa ggagacagtc ataatgaaat acctattgcc tacggcagcc gctggattgt 60

[0055] tattactcgc ggcccagccg gccatggccg aggtgcagct gttggagtct gggggaggct 120

[0056] tggtacagcc tgggggggtcc ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc acctttagca 180

[0057] gctatgccat gagctgggtc cgccaggctc cagggaaggg gctggagtgg gtctcatcga 240

[0058] ttagtaagca tggtagtagg acaacttacg cagactccgt gaagggccgg ttcaccatct 300

[0059] ccagagacaa ttccaagaac acgctgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaggaca 360

[0060] cggccgtata ttactgtgcg aaacggagta ggctgtttga ctactggggc cagggaaccc 420

[0061] tggtcaccgt ctcgagcggt ggaggcggtt caggcggagg tggcagcggc ggtggcgggt 480

[0062] cgacggacat ccagatgacc cagtctccat cctccctgtc tgcatctgta ggagacagag 540

[0063] tcaccatcac ttgccgggca agtcagagca ttagcagcta tttaaattgg tatcagcaga 600

[0064] aaccagggaa agcccctaag ctcctgatct atcatgcatc ccacttgcaa agtggggtcc 660

[0065] catcaaggtt cagtggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc agcagtctgc 720

[0066] aacctgaaga ttttgcaact tactactgtc aacagcggca tcagcggcct cggacgttcg 780

[0067] gccaagggac caaggtggaa atcaaacggg cggccgcaca tcatcatcac catcacgggg 840

[0068] ccg 843

[0069] 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 :

[0070]

H-CDR1

[0071] MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS*GFTFSSYA*MSWVR 60

[0072] *H-CDR2* --

[0073] QAPGKGLEWVS*SISKHGSRT7*YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA*K* 120

[0074] *H-CDR1* ----------*Link*---------- ------

[0075] *RSRLFDY*WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT*CRAS* 180

[0076] *L-CDR1* *L-CDR2*

[0077] *QSISSYL*NWYQQKPGKAPKLLI*YHASHL*QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY 240

[0078] *L-CDR3* *His-tag*

[0079] Y*CQQRHQRPR*TFGQGTKVEIKRAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAASTP 291

[0080] 申请人将此抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体自命名为 E8。

[0081] 实施例 2 制备 E8 的初级培养物

[0082] 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 ℃孵育 2 h,加入 100 μl 滴度为 10^{12}的辅助噬菌体 KM13 进行救援,30 ℃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 ℃、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。

[0083] 实施例 3 E8 的亚型鉴定

[0084] (1) 竞争抑制 ELISA 检测实验

[0085] 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

[0086] 表 1 竞争抑制 ELISA 检测实验溶液配制

[0087]

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	20 μl		30 μl
对照组 3		20 μl	30 μl
实验组 4	30 μl		20 μl

对照组 4		30 μl	20 μl
实验组 5	40 μl		10 μl
对照组 5		40 μl	10 μl
实验组 6	50 μl		
对照组 6		50 μl	

[0088] 表 1 中 E8 为实施例 2 获得的含 E8 初级培养物的上清液；

[0089] 分别向表 1 配制好的溶液中加入 50 μl 10 μg/ml 的抗 Cry1C 多克隆抗体 37 ℃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 ℃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 H_2SO_4 快速终止反应；用酶标仪测定 OD_{450} 值。

[0090] 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。

[0091] （2）生物学测定实验

[0092] 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：

[0093] （a）封闭：将 100 μl/ 孔 5 μg/ml BBMV 包被于 96 孔板中，4 ℃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；

[0094] （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：

[0095] 表 2 E8 生物学测定实验溶液配制

[0096]

分组	2 μg/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		40 μl	
实验组 2	50 μl	30 μl		20 μl	
实验组 3	50 μl	50 μl			
阳性对照组	50 μl				50 μl
阴性对照组 1	50 μl		10 μl	40 μl	
阴性对照组 2	50 μl		30 μl	20 μl	
阴性对照组 3	50 μl		50 μl		

[0097] 表 2 中，E8 为实施例 2 获得的含 E8 初级培养物的上清液；

[0098] （c）将步骤 b 加样后的 96 孔板于室温下孵育 2 h，每孔用 250 μl PBST 洗板 3 次后，然后每孔加入 100 μl 10 μg/ml 抗 Cry1C 多克隆抗体，再每孔用 250 μl PBST 洗板 3 次，每孔加入 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，每孔加入 100 μl 底物显色溶液，室温下反应 10~20 min 至出现蓝色，最后每孔加入 50 μl 浓度为 2 mol/L 的 H_2SO_4 快速终止反应后，用酶标仪测定 OD_{450} 值。

[0099] 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。

[0100] 实施例 4 抗 Cry1C 毒素独特型单链抗体杀虫活性验证

[0101] 实验分为实验组与对照组：

[0102] 实验组用实施例 2 获得的含有 E8 初级培养物的上清液(E8)；

[0103] 阳性对照组采用浓度为 0.2g/L 的 Cry1Ab 毒素(CK+)；

[0104] 阴性对照组采用非“β”类型的 Anti-Id ScFvs (CK-)；

[0105] 实验步骤：

[0106] 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。

[0107] 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。

SEQUENCE LISTING

<110> 江苏省农业科学院

<120> 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

<130> 2

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 843

<212> DNA

<213> 人工筛选

<400> 1

tctatttcaa ggagacagtc ataatgaaat acctattgcc tacggcagcc gctggattgt 60
tattactcgc ggcccagccg gccatggccg aggtgcagct gttggagtct gggggaggct 120
tggtacagcc tggggggtcc ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc acctttagca 180
gctatgccat gagctgggtc cgccaggctc agggaaggg gctggagtgg gtctcatcga 240
ttagtaagca tggtagtagg acaacttacg cagactccgt gaagggccgg ttcaccatct 300
ccagagacaa ttccaagaac acgctgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaggaca 360
cggccgtata ttactgtgcg aaacggagta ggctgtttga ctactggggc cagggaaccc 420
tggtcaccgt ctcgagcggt ggaggcggtt caggcggagg tggcagcggc ggtggcgggt 480
cgacggacat ccagatgacc cagtctccat cctccctgtc tgcatctgta ggagacagag 540
tcaccatcac ttgccgggca agtcagagca ttagcagcta tttaaattgg tatcagcaga 600
aaccagggaa agcccctaag ctcctgatct atcatgcatc ccacttgcaa agtggggtcc 660
catcaaggtt cagtggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc agcagtctgc 720
aacctgaaga ttttgcaact tactactgtc aacagcggca tcagcggcct cggacgttcg 780
gccaagggac caaggtggaa atcaaacggg cggccgcaca tcatcatcac catcacgggg 840
ccg 843

<210> 2

<211> 291

<212> PRT

<213> 人工筛选

<400> 2

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
20 25 30
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Lys His Gly Ser Arg Thr
65 70 75 80
Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
85 90 95
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100 105 110
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Arg Leu Phe Asp Tyr Trp
115 120 125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln
145 150 155 160
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
165 170 175
Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
180 185 190
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser His Leu
195 200 205
Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
210 215 220
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
225 230 235 240
Tyr Cys Gln Gln Arg His Gln Arg Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr
245 250 255
Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala His His His His His His Gly
260 265 270
Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
275 280 285
Ser Thr Pro
290

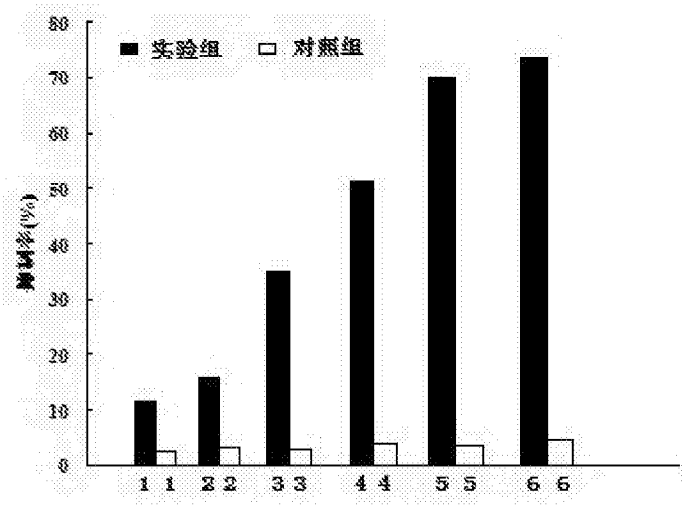

实验组
对照组
1 1
2 2
3 3
4 4
5 5
6 6

图 1

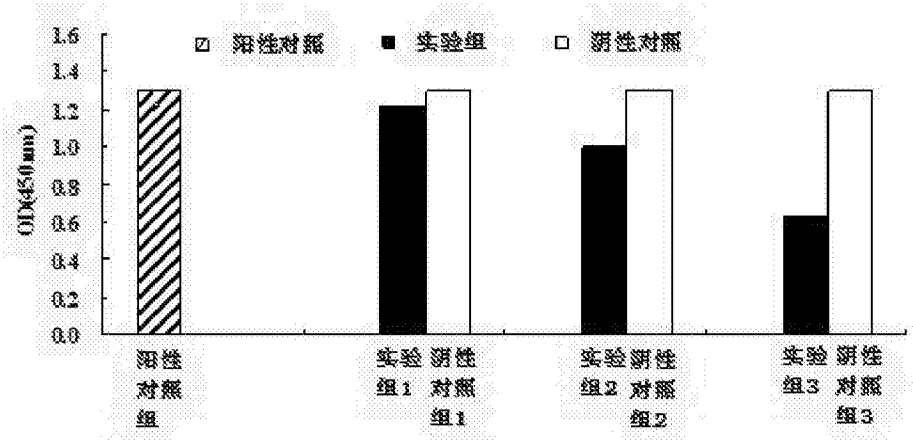

阳性对照
实验组
阴性对照
(OD450nm)
阳性对照组
实验组1
阴性对照组1
实验组2
阴性对照组2
实验组3
阴性对照组3

图 2

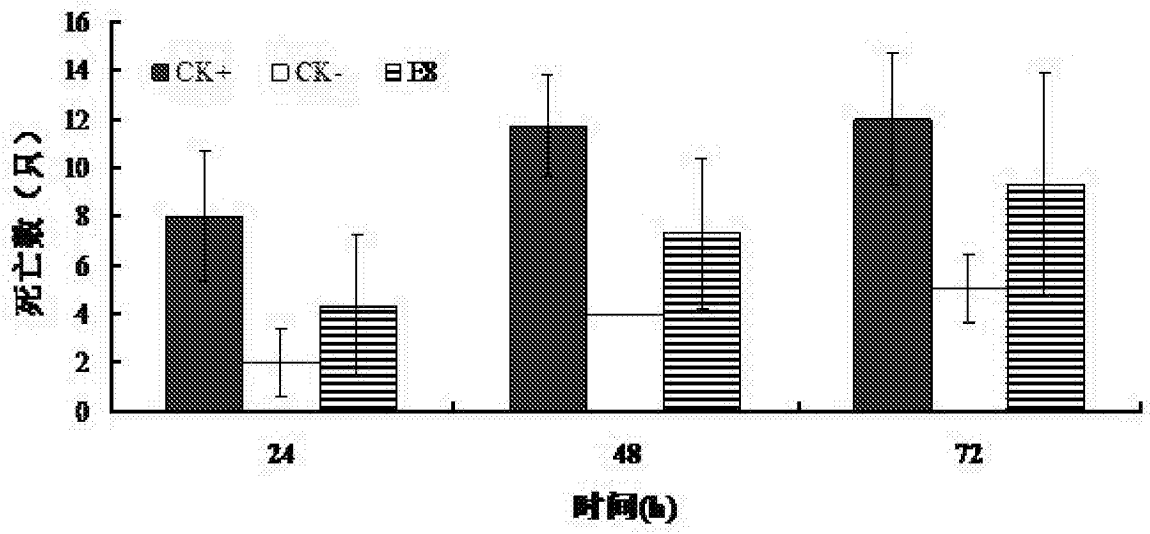

16
14
12
10
8
6
4
2
0
CK+
CK-
E8
死亡数（只）
24
48
72
时间(h)

图 3

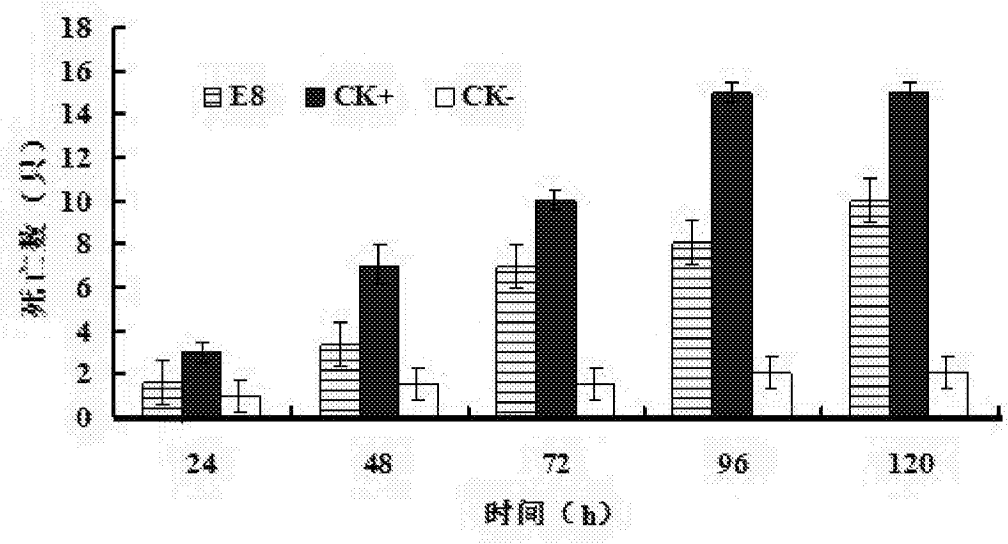

18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
E8
CK+
CK-
死亡数（只）
24
48
72
96
120
时间（h）

图 4