



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103773774 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201410037000. 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)

C07K 16/42(2006. 01)

A01N 47/44(2006. 01)

A01P 7/04(2006. 01)

(56) 对比文件

Xiao Zhang et al..Rapid isolation
of single-chain antibodies from a human
synthetic phage display library for
detection of *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Cry1 Btoxin.《Ecotoxicology and Environmental
Safety》.2012, 第 81 卷材料和方法.

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 卷材料和方法.

徐重新 等. 抗苏云金芽孢杆菌 Cry1B 毒
蛋白质单链抗体的筛选与鉴定.《江苏农业学
报》.2012, 第 28 卷(第 4 期), 材料与方法、第
2.3 节.

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》.2013, 第 36 卷(第 3 期), 全文.

审查员 赵鹏

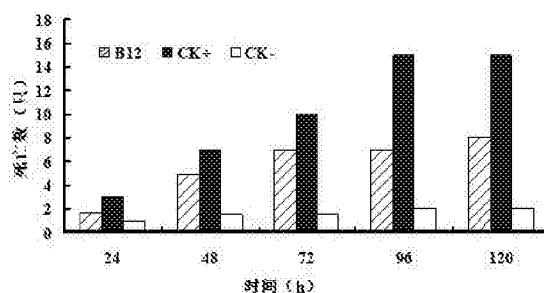
权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一种人源抗虫基因及其编码的抗 Cry1Ab 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 Cry1Ab 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
Cry1Ab 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。



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 Cry1Ab 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 Cry1Ab 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 Cry1Ab 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 Cry1Ab 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 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1C、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。

[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] 人源化的抗体基因因其来源于人类,具有与人类免疫系统基因同源的优势,可以避免在其制剂喷洒或转基因表达后在食品中的残留而对人体免疫系统造成危害。

[0005] 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。

[0006] 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 毒素活性效应物,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)等相关材料及产品还未见报道。

发明内容

[0007] 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:

[0008] 1. 一种人源抗虫基因,其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

[0009] 2. 本发明中,由 SEQ ID NO. 1 编码的抗 Cry1Ab 毒素独特型单链抗体,其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

[0010] 3. 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。

[0011] 4. 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。

[0012] 5. 本发明中,一种含氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示的抗 Cry1Ab 毒素独特型单链抗体的杀虫剂。

[0013] 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 Cry1Ab 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 Cry1Ab 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

[0014] 图 1 为 B12 ELISA 检测结果示意图。

[0015] 图 2 为 B12 生物学测定结果示意图。

[0016] 图 3 为分别喂食经 B12、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。

[0017] 图 4 为分别喂食经 B12、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

[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, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g, KH₂PO₄ 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, pH=5.5)：

[0038] 取 C₆H₇O₈ (柠檬酸) 21 g, Na₂HPO₄·12H₂O 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% H₂O₂。

[0043] 实施例所涉及材料来源：

[0044] 抗 Cry1Ab 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] 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 Cry1Ab 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 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-AKG 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;

[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 μ g/ml 的抗 Cry1Ab 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 Cry1Ab 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 培养过夜, 次日 1800 g 离心 30 min, 分别取上清液;

[0052] (3) 取 4 μ g/ml 的抗 Cry1Ab 多克隆抗体加入到 96 孔板中, 100 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 Cry1Ab 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 Cry1Ab 毒素独特型单链抗体核苷酸序列为 SEQ ID NO. 1 如下:

[0054] caggaaacag ctatgacat gattacgcca agcttgcatg caaattctat ttcaaggaga 60

[0055] cagtcataat gaaataccta ttgcctacgg cagccgctgg attgttatta ctgcggcccc 120

[0056] agccggccat ggccgaggtg cagctgttgg agtctggggg aggcttgtag agcctggggg 180

[0057] ggtccctgag actctcctgt gcagcctctg gattcacctt tagcagctat gccatgagct 240

[0058] gggctccgcca ggctccaggg aaggggctgg agtgggtctc atatatttcg aatgagggta 300

[0059] cgacgacaat gtacgcagac tccgtgaagg gccgggttac catctccaga gacaattcca 360

[0060] agaacacgct gtatctgcaa atgaacagcc tgagagccga ggacacggcc gtatattact 420
 [0061] gtgcgaaacc ttggtcggcg ttgtactact ggggccaggg aaccctggtc accgtctcga 480
 [0062] gcggttgagg cggttcaggc ggaggtggca gcggcggtgg cgggtcgacg gacatccaga 540
 [0063] tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc atcacttgcc 600
 [0064] gggcaagtca gagcattagc agctatttaa atttggtatca gcagaaacca gggaaagccc 660
 [0065] ctaagctcct gatctatgct gcatcccggt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagtg 720
 [0066] gcagtggatc ctgggacaga ttctactctc accatcagca gtctgcaacc tgaagatttt 780
 [0067] gaacttacta ctgtcaacag acttctcacc ctctctgac gttcggccaa gggaccaagg 840
 [0068] tggaaatcaa acgggcggcc gcacatcacc atcaccatca cggggccgca gaacaaaaac 900
 [0069] tcatctcaga agaggatctg aatggggccg catag 935

[0070] 以 Sanger 测序法测定筛选到的抗 Cry1Ab 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:

[0071] H-CDR1
 [0072] MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLLESGLVQPGLSLRLSCAASGFTFSSYMSWVR 60
 [0073] H - C D R 2

[0074] QAPGKGLEWVSRHHTSGDSTQADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK 120

[0075] H-CDR3 -----Link-----

[0076] DYRWFYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTDIMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS 180

[0077] L-CDR1 L-CDR2

[0078] QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY 240

[0079] L-CDR3 His-tag

[0080] YCQQAASEAPSTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHHGAEEQKLISEEDLNGAASP 291

[0081] 申请人将此抗 Cry1Ab 毒素独特型单链抗体自命名为 B12。

[0082] 实施例 2 制备 B12 的初级培养物

[0083] (1) 将实施例 1 筛选到的含有抗 Cry1Ab 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 B12 初级培养物的上清液。

[0084] 实施例 3 B12 的亚型鉴定

[0085] (1) 竞争抑制 ELISA 检测实验

[0086] 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

[0087] 表 1 竞争抑制 ELISA 检测实验溶液配制

[0088]

分组	B12	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 μ l		40 μ l
对照组 2		10 μ l	40 μ l
实验组 3	20 μ l		30 μ l
对照组 3		20 μ l	30 μ l
实验组 4	30 μ l		20 μ l
对照组 4		30 μ l	20 μ l
实验组 5	40 μ l		10 μ l
对照组 5		40 μ l	10 μ l
实验组 6	50 μ l		
对照组 6		50 μ l	

[0089] 表 1 中, B12 为实施例 2 获得的含 B12 初级培养物的上清液;

[0090] 分别向表 1 配制好的溶液中加入 50 μ l 10 μ g/ml 的抗 Cry1Ab 多克隆抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 后分别加入到包被有 2 μ g/ml Cry1Ab 毒素的 96 孔板中(所述包被有 2 μ g/ml Cry1Ab 毒素的 96 孔板为前一天取 2 μ g /ml 的 Cry1Ab 毒素加入到 96 孔板中, 100 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜)反应 2 h; 每孔用 250 μ l PBST 洗板 3 次后每孔分别加入 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 次后, 每孔分别加入 100 μ l 底物显色溶液, 室温下反应 10~20 min 至出现蓝色, 最后每孔分别加入 50 μ l 浓度为 2 mol/L 的 H_2SO_4 快速终止反应; 用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。

[0091] 实验结果如图 1 所示, 可见抑制率随着 B12 含量的增加而增大, 对照组则无竞争抑制现象, 说明 B12 为 β 型抗独特型单链抗体, 能够模拟 Cry1Ab 毒素与其竞争结合抗 Cry1Ab 毒素多克隆抗体。

[0092] (2) 生物学测定实验

[0093] 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:

[0094] (a) 封闭: 将 100 μ l/孔 5 μ g/ml BBMV 包被于 96 孔板中, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 次日每孔用 250 μ l PBST 洗板 3 次后, 分别加入 200 μ l 质量比为 3 % 的 BSA 于室温孵育 2 h, 进行封闭;

[0095] (b) 加样: 将步骤 1 封闭后的 96 孔板用 250 μ l/孔 的 PBST 洗板 3 次后, 分别向 96 孔板按照表 2 进行加样:

[0096] 表 2 B12 生物学测定实验溶液配制

[0097]

分组	2 μ g/ml Cry1Ab 毒素	B12	非“ β ”类型的 Anti-Id ScFv	2 $\times$ TY-AG 液体培养基	CPBS
实验组 1	50 μ l	10 μ l		40 μ l	
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		

[0098] 表 2 中, B12 为实施例 2 获得的含 B12 初级培养物的上清液;

[0099] (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 Cry1Ab 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 H_2SO_4 快速终止反应后,用酶标仪测定 OD_{450} 值。

[0100] 实验结果如图 2 所示,与阳性对照相比,抗 Cry1Ab 毒素独特型单链抗体 B12(实验组 1、2、3)能够抑制 Cry1Ab 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 B12 为“ β ”类型。

[0101] 实施例 4 抗 Cry1Ab 毒素独特型单链抗体杀虫活性验证

[0102] 实验分为实验组与对照组:

[0103] 实验组用实施例 2 获得的含有 B12 初级培养物的上清液(B12);

[0104] 阳性对照组采用浓度为 0.2g/L 的 Cry1Ab 毒素(CK+);

[0105] 阴性对照组采用非“ β ”类型的 Anti-Id ScFvs (CK-);

[0106] 实验步骤:

[0107] 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。

[0108] 实验结果如图 3、4 所示,其中,图 3 为 分别喂食经 B12、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 B12、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, B12 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 Cry1Ab 毒素独特型单链抗体与应用
 <130> 2
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 935
 <212> DNA
 <213> 人工筛选
 <400> 1

```

caggaaacag ctatgaccat gattacgcca agcttgcatg caaattctat ttcaaggaga      60
cagtcataat gaaataccta ttgcctacgg cagccgctgg attgttatta ctgcgggccc      120
agccggccat ggccgaggtg cagctgttgg agtctggggg aggcctgtac agcctggggg      180
ggtccttgag actctcctgt gcagcctctg gattcacctt tagcagctat gccatgagct      240
gggtccgcca ggctccaggg aaggggctgg agtgggtctc atatatattcg aatgagggta      300
cgacgacaat gtacgcagac tccgtgaagg gccgggtcac catctccaga gacaattcca      360
agaacacgct gtatctgcaa atgaacagcc tgagagccga ggacacggcc gtatattact      420
gtgcgaaacc ttggtcggcg ttgtactact ggggccaggg aaccctggtc accgtctcga      480
gcggtggagg cgggttcaggc ggaggtggca gcggcggtgg cgggtcgacg gacatccaga      540
tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc atcacttgcc      600
gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca gggaaagccc      660
ctaagctcct gatctatgct gcateccggt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagtg      720
gcagtggatc ctgggacaga ttctactctc accatcagca gtctgcaacc tgaagatttt      780
gaacttacta ctgtcaacag acttctcacc ctctctgac gttcggccaa gggaccaagg      840
tggaatcaa acgggcggcc gcacatcacc atcaccatca cggggccgca gaacaaaaac      900
tcatctcaga agaggatctg aatggggccg catag                                935

```

- <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 Arg Ile His Thr Ser Gly Asp Ser Thr		
65	70	75 80
Gln 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 Asp Tyr Arg Trp 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 Gly Ala Ser Thr 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 Ala Ser Glu Ala Pro Ser 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		

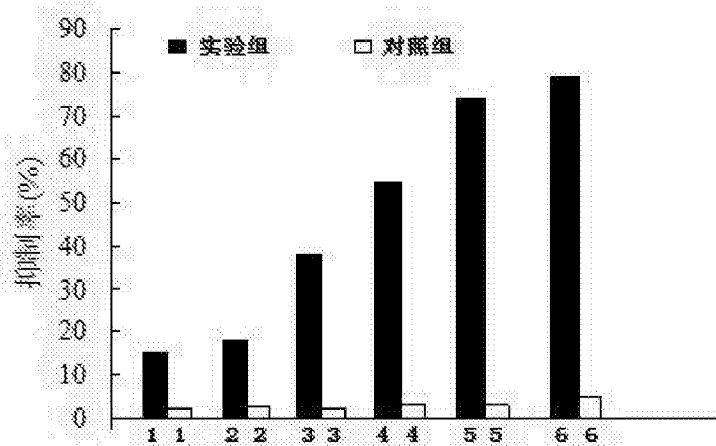


图 1

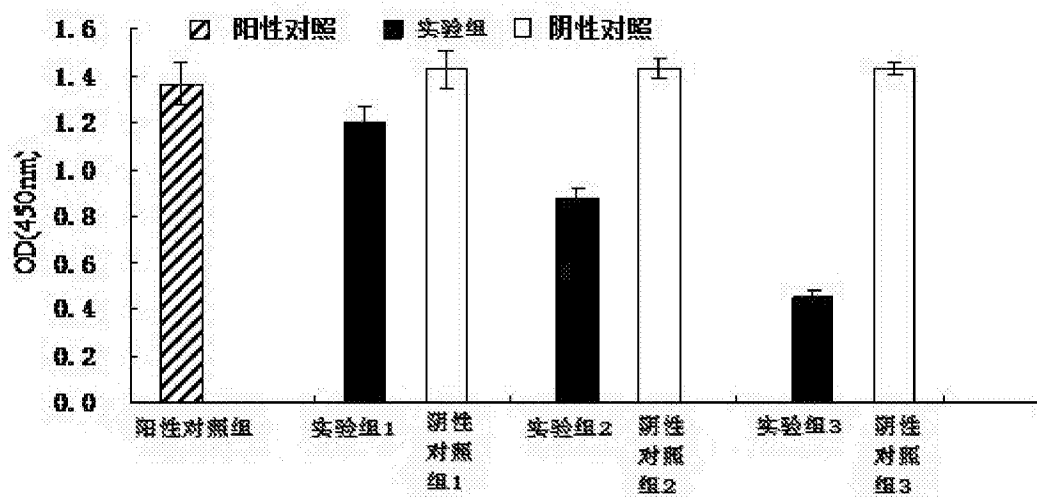


图 2

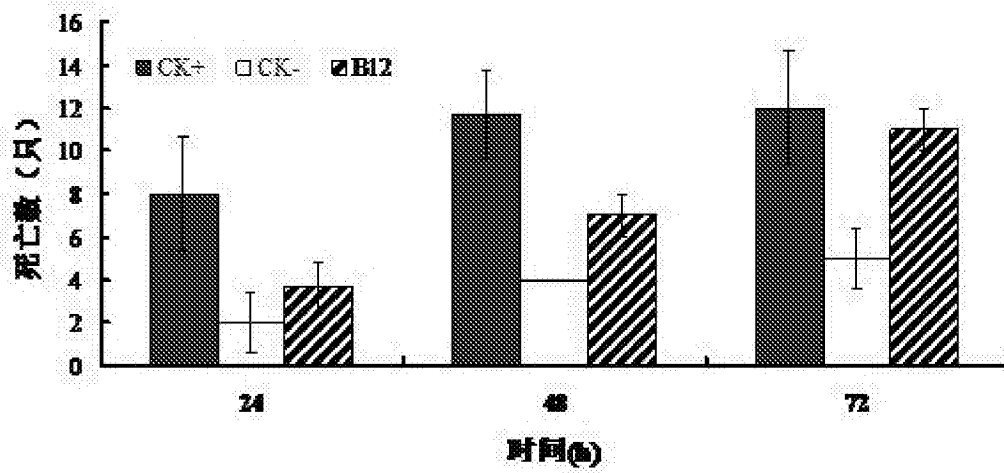


图 3

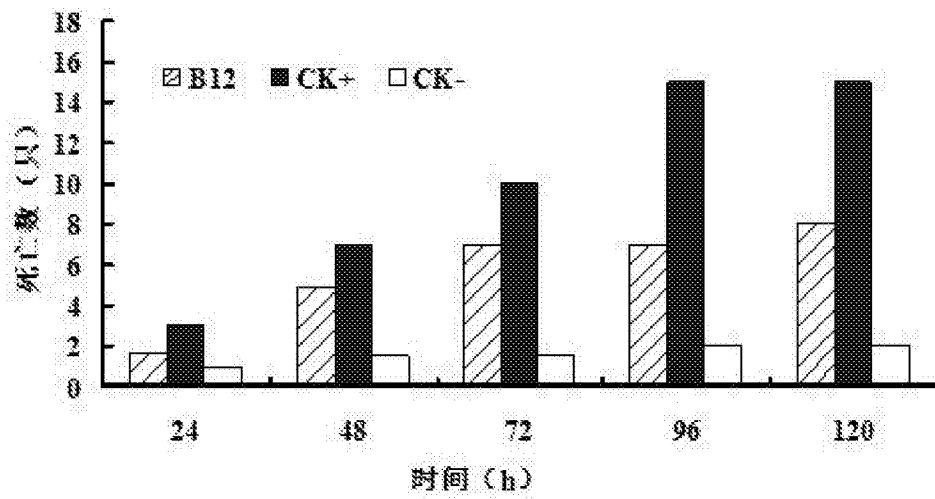


图 4