

## 说明书

### 抗蓝藻重组抗体多肽及其基因与制备方法

#### 技术领域

本发明涉及环保生物技术，特别是一种抗蓝藻重组抗体多肽及其基因与制备方法。

#### 背景技术

水体过度营养化造成的蓝藻增生、水体污染是目前威胁世界范围水环境的最大危害，给人类造成巨大的经济损失，给地球生物圈造成无法修复的危害。随着我国经济发展造成的加速工业化和城镇化，生态环境污染和恶化日益加剧，水环境生态防治已成为我们必需面对和解决的重大问题。

现用抗菌药物对蓝藻基本无效；蓝藻属细菌域第 X 门-蓝细菌门的一类原核细胞，目前能够控制蓝藻的只有重金属类化学制剂，如硫酸铜等。而在实际应用中，由于效果有限，往往不惜超剂量多次重复用药，造成的结果是在杀伤蓝藻的同时也将水体中其他有益藻类、水生植物和生物破坏殆尽，给环境造成了无法逆转的永久性破坏。同时重金属类化学制剂在环境和农产品的残留量越来越大，因此人类急需开发高效且使用安全的抗蓝藻药物。

#### 发明内容

本发明的一个目的在于提供一种新型的重组抗蓝藻多肽的基因、重组质粒、多肽；此种多肽能特异的杀灭蓝藻细胞而不会伤害其他藻类细胞、植物和动物。本发明的再一目的是提供上述重组抗蓝藻多肽的制备方法。

杂交瘤细胞，其保藏号为：CGMCC No.4783。

上述杂交瘤分泌的单克隆抗体。

具有蓝藻识别结合能力的模拟抗体多肽，是上述单克隆抗体的抗原结合片段，或根据上述单克隆抗体的抗原结合片段上的功能区域设计而得的小分子多肽。

所述模拟抗体多肽其氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

编码上述模拟抗体多肽的基因。

所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

抗蓝藻重组抗体多肽，由上述具有蓝藻识别结合能力的模拟抗体多肽可操作地线性连接在大肠菌素多肽的羧基端构成，所述大肠菌素选自大肠菌素 E1, Ia, Ib, A, B 或 N。

所述抗蓝藻重组抗体多肽，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示。

编码上述抗蓝藻重组抗体多肽的基因。

所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。

含有编码上述抗蓝藻重组抗体多肽的基因的重组表达载体。

上述抗蓝藻重组多肽的制备方法，其步骤如下：将编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因导入到大肠杆菌表达系统中，培养转化的大肠杆菌，然后分离大肠杆菌表达的多肽。

上述抗蓝藻重组抗体多肽在治理水体过度营养化中的应用。

本发明提供一种抗蓝藻重组抗体多肽，由大肠菌素多肽和抗蓝藻细胞表面抗原的抗体模拟物多肽组合而成。在该多肽分子中，抗蓝藻细胞表面抗原的抗体模拟物用于识别并结合蓝藻使分子中的大肠菌素攻击蓝藻。由于抗体模拟物为识别蓝藻表面抗原的抗体模拟物，因此本发明的多肽具有专门攻击蓝藻细胞而不损害其它水体生物，因而不会污染水源，用于水体蓝藻污染的治理非常环保和安全。本发明的抗蓝藻重组抗体多肽的基于 CGMCC No.4783 杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体的抗原结合片段（Fab）的轻链和重链的氨基酸序列及核苷酸序列设计出的具有蓝藻识别结合能力的抗体模拟物，如单链抗体、抗体小分子模拟物等本领域已经熟知的抗体模拟物。在本发明中，设计的抗体模拟物只需要具有抗原识别能力即可实现发明目的，因为抗体模拟物的任务只是引导重组多肽分子到达目标生物细胞表面，然后由重组多肽中的大肠菌素在目标细胞膜上制造离子通道从而是目标细胞内容物泄露而死。因此，基于上述单克隆抗体设计的抗体模拟物，只要能起到识别目标抗原的目的，这些抗体模拟物与大肠菌素连接而成的重组多肽都属于本发明保护的范围。

在本发明的优选实施方式中，抗体模拟物为抗蓝藻原生质体表面抗原的单

克隆抗体（由 CGMCC No.4783 的杂交瘤细胞分泌）的几个结构域  $V_H$ CDR1、 $V_H$ FR2 和  $V_L$ CDR3 按  $V_H$ CDR1- $V_H$ FR2- $V_L$ CDR3 结构连接而成的 28 肽抗体模拟物。室内外实验证明，该抗体模拟物构成的抗蓝藻多肽可以在水介质中自由游动，具有自动寻找蓝藻细胞表面抗原的生物学活性。28 肽抗体模拟物构成具有易于克隆和表达且具有与原始抗体相同的识别活性的优点，可以引导重组多肽中的大肠菌素到达蓝藻细胞膜上形成离子通道来杀伤这些蓝藻细胞，该重组多肽具有现用治理水污染药物（如硫酸铜等）所无法比拟的、具有生态-环境安全性。

本发明中，构建重组抗蓝藻多肽的大肠菌素可选自能形成离子通道的大肠菌素 E1, Ia, Ib, A, B 或 N，在本发明的实施例验证了大肠菌素 Ia 与抗蓝藻抗体模拟物构建的重组多肽，但本发明利用的是这些大肠菌素在细菌胞膜上形成离子通道来杀死细菌的这一共性，因此，按照本发明的构思，这些大肠菌素与抗蓝藻的抗体模拟物多肽线性连接构成的重组多肽都能够实现本发明的目的——即提供能够杀死蓝藻的重组多肽。

本发明还提供了包含重组多肽的基因的重组质粒的制备方法，是将编码抗体模拟物的核苷酸序列经双链寡聚核苷酸点突变技术插入大肠菌素的羧基端形成本发明的重组质粒。以选用大肠菌素 Ia 为例，将编码抗体模拟物的核苷酸序列插入 Ia 基因的第 626 位氨基酸后（羧基端）而形成本发明的重组质粒。构建重组质粒的原始商用质粒 pSELECT-1 来自于 Promega 公司，其中装载了大肠菌素 Ia 和相应的 Immunity 蛋白基因，针对抗体模拟物基因设计了数对引物，其序列见实施例 1。利用双链寡聚核苷酸点突变技术，按照 Strategene 公司试剂盒操作获得重组质粒，例如 pCHCcyanoMA1。

本发明的又一方面，提供本发明所述抗蓝藻多肽的制备方法，将编码抗体模拟物的基因可操作地与大肠菌素基因连接获得编码重组抗蓝藻多肽基因的重组质粒，将获得的重组质粒转染入大肠杆菌工程菌中而获得可产生重组抗蓝藻多肽的工程菌细胞。用离子交换柱分离纯化即获得本发明所述的抗蓝藻多肽。

本发明所述抗蓝藻多肽可用于治理水污染。可以通过将本发明中的多肽添加可接受的载体或赋形剂或可选的其它成分而制成适于环境使用的药物组合

物。其机理是：多肽中可与蓝藻细胞表面抗原识别的抗体模拟物诱导大肠菌素到达蓝藻细胞膜附近，然后大肠菌素离子通道结构域的疏水区段插入蓝藻细胞膜中，进而大肠菌素离子通道结构域在蓝藻细胞膜上形成离子通道，使蓝藻细胞内容物泄漏而致蓝藻细胞死亡，从而达到杀死蓝藻细胞的目的。

本发明所述的抗蓝藻多肽相较于传统抗蓝藻药物的优点在于，其具有特异的靶向性，因而在治理过程中不会攻击其他藻类、植物和动物细胞，其毒性和不良反应远低于传统抗蓝藻药物。再由于它是在蓝藻细胞膜上直接形成离子通道来杀伤蓝藻细胞，因此在抗蓝藻多肽一离子通道造成泄漏而致蓝藻细胞死亡的这一较短时限内，蓝藻细胞较难利用突变基因一蛋白表达方式来修复抗蓝藻多肽一离子通道在蓝藻细胞膜上造成的几何缺损，所以蓝藻细胞对本发明的抗蓝藻多肽产生耐药性的概率较低。这预示本发明所述抗蓝藻多肽具有良好的应用前景。

杂交瘤保藏信息：

保藏号：CGMCC No.4783

杂交瘤名称：抗蓝藻细胞表面抗原的单克隆抗体杂交瘤细胞

保藏日期：2011 年 4 月 20 日

保藏单位：中国微生物菌种保藏管理委员会 普通微生物中心

保藏单位地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号。

## 附图说明

图 1.是含有抗体模拟物和大肠菌素 Ia 基因的重组质粒 pCHCcyanoMA1 的结构示意图。

图 2.为抗蓝藻多肽结构示意图。

图 3.是含有部分基因颠倒 N-C 顺序的抗体模拟物基因和大肠菌素 Ia 基因的重组质粒 pCHCcyanoMA2 的结构示意图。

图 4.为本发明抗蓝藻多肽对生长于液体培养基中铜绿微囊藻的抑制试验结果。

图中 A，空白对照液，B，氨苄青霉素 50  $\mu$ g/ml，C，广谱信息菌素 (Ph-NM)

50  $\mu\text{g/ml}$ , D, 抗蓝藻多肽 (1) 50  $\mu\text{g/ml}$ , E, 抗蓝藻多肽 (2) 50  $\mu\text{g/ml}$ 。  
图 5. 为本发明抗蓝藻多肽 (1) 对生长于液体培养基中铜绿微囊藻的抑制试验结果。

图中 A, 处理 48 小时后, B, 处理 72 小时后, C, 处理 96 小时后。图中每一列从左至右共 6 个烧瓶, 依次为 1, 对照, 2, 0.1  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1), 3, 0.5  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1), 4, 1  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1), 5, 5  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1), 6, 10  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1)。

图 6. 为本发明抗蓝藻多肽 (1) 对生长于液体培养基中栅藻的抑制试验结果。

处理 10 日后, 图中每一列从左至右共 6 个烧瓶, 依次为 1, 对照, 2, 1  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1), 3, 5  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1), 4, 10  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1), 5, 15  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1), 6, 20  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1)。

图 7. 为本发明抗蓝藻多肽 (1) 对生长于液体培养基中铜绿微囊藻、栅藻的抑制试验结果。上图为铜绿微囊藻的结果, 下图为栅藻的试验结果。

图 8. 为本发明抗蓝藻多肽对生长于液体培养基中铜绿微囊藻、鱼腥藻、小球藻、栅藻的抑制试验结果。

图中左侧烧瓶为对照, 右侧烧瓶为 35  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1)。A, 铜绿微囊藻, B, 鱼腥藻, C, 小球藻, D, 栅藻。

图 9. 为本发明抗蓝藻多肽对蓝藻污染的自然水体抑制试验结果。

图中 A, 空白对照, B, 抗蓝藻多肽 (1) 1  $\mu\text{g/ml}$ , C, 抗蓝藻多肽 (1) 5  $\mu\text{g/ml}$ , D, 抗蓝藻多肽 (1) 10  $\mu\text{g/ml}$ , E, 硫酸铜 0.7  $\mu\text{g/ml}$ 。  
图 10. 为图 9 抑制试验的部分测试结果。

A, 水体中光密度变化, B, 水体中叶绿素 a 变化, C, 水体中 pH 变化, D, 水体中优势藻类种群变化。

D-1, 对照组, D-2, 1  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1) 处理组, D-3, 0.7  $\mu\text{g/ml}$  硫酸铜处理组。

图 11. 为图 9 中抗蓝藻多肽对蓝藻污染的自然水体抑制试验的显微镜观察结

果（放大 400 倍）。

分别为对照、抗蓝藻多肽（1） $1\ \mu\text{g/ml}$  和硫酸铜  $0.7\ \mu\text{g/ml}$  处理水体中藻类（鱼腥藻）在 A, 第一日, B, 第二日, C, 第三日, D, 第四日, E, 第五日的变化。

## 具体实施方式

### 实施例 1 表达抗蓝藻多肽的质粒的构建和重组抗蓝藻多肽的制备

材料：杂交瘤细胞 CGMCC No.4783。

步骤 1. 抗体模拟物的核苷酸序列及氨基酸序列的获得：收集杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体，采用常规方法对单克隆抗体进行测序获得抗原结合片段 Fab 重链和轻链序列后，根据抗原互补决定区的氨基酸序列设计得到抗体模拟物氨基酸序列，如 SEQ ID NO.3 所示，编码该抗体模拟物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

步骤 2. 原始质粒为装载了大肠菌素 Ia 和 Immunity 蛋白基因的 pSELECT-1 质粒(购自 Promega 公司，上述基因由本实验室装载)，经双链寡聚核苷酸点突变技术(QuickChange™ Kit, Stratagene 公司)将编码抗蓝藻的抗体模拟物的基因（序列表中 SEQ ID NO.2 所述核苷酸序列）插入到大肠菌素 Ia 基因的 I626 位点后，得到重组质粒 pCHCcyanoMA1(如图 1 所示)，重组质粒转染入 *E.coli* B834 (DE3) 工程菌里表达制备多肽，获得序列表如 SEQ ID NO.7 所述的抗蓝藻多肽，在后续的实施例中称为“抗蓝藻多肽（1）”，其分子量约 70,000。

突变程序按 Stratagene QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (catalog#200518)药箱手册进行：

#### 1、准备点突变反应物

5  $\mu\text{l}$  10 x buffer

2  $\mu\text{l}$  (10 ng) 野生型大肠菌素 Ia 质粒

1  $\mu\text{l}$  (125ng) 设计的 5'-3' 寡聚核苷酸引物

1  $\mu\text{l}$  (125ng) 设计的 3'-5' 寡聚核苷酸引物

1  $\mu\text{l}$  dNTP

双蒸水 50 ul

1 ul pfu

(除质粒, 引物和双蒸水外,均为药箱所备试剂)

2、进行 PCR 扩增, 扩增条件: 变性 95℃, 35 秒, 退火 53℃, 70 秒, 延伸 68℃, 17 分共 20 个循环;

3、加入 Dpn1 内切酶 1 ul 消化母体 DNA 链后(37℃,1 小时), 取 1 ul 反应物与 HMS174 感受态细胞 50 ul 冰孵 30 分钟, 行热冲击 42℃, 45 秒, 再置入冰中 2 分钟;

4、加入 NZY 培养基 0.5 ml 后 220rpm, 37℃摇菌 1 小时后, 取 50-100 ul 反应物铺板( LB 培养基加 1%琼脂加 50 ug/ml 氨苄青霉素, 37℃过夜);

5、18 小时后挑菌,循 Qiagene,Gibco 等公司的各种商用提取质粒药箱提取质粒均可,测序确定突变成功;

6、将质粒 50 ng 与制备的 *E.coli* B834 (DE3) 工程菌感受态细胞 50 ul 冰孵 30 分, 42℃, 30 秒热冲击, 取 50-100 ul 反应物加入 SOC 培养基 0.5 ml, 220 rpm, 37℃摇菌 1 小时后铺板( LB 培养基加 1 % 琼脂加 50 ug/ml 氨苄青霉素) 37℃孵育,12-16 小时后挑取菌落;

7、大量增菌,8-16 升 LB 培养基, 250rpm, 37℃,6-8 小时;离心沉淀菌体, 4℃, 6000g, 20 分钟,取 4℃, 50 mM Borate, 2mM EDTA, pH 9.0) 50-80ml 悬浮菌体,加入 0.2 M PMSF 250 微升后行超声破碎(4℃, 400W, 2 分钟), 高速离心沉淀破碎菌体(4℃, 75000g, 1.5 小时), 取上清经硫酸链霉素沉淀 DNA, 装入分子量 15,000 的透析袋于 4℃, 50 mM Borate, 2mM EDTA, pH 9.0 缓冲液 10 升 透析过夜后, 将上清上样于 CM 柱(Amersham Biosciences), 经 50 mM Borate, 0.3 M NaCl, 2mM EDTA, pH 9.0 缓冲液, 4℃) 洗脱后即可得到重组抗蓝藻多肽 (1) (请见图 2)。

下面列出为制备 pCHCcyanoMA1 质粒的抗体模拟物基因所设计的具体双链寡聚核苷酸序列:

pCHCcyanoMA1

1、 5'-3'

gcg aat aag ttc tgg ggt att TCT TAT TGG ATG CAG TGG GTT AAG CAA

taa ata aaa tat aag aca ggc

3'-5'

gcc tgt ctt ata ttt tat tta TTG CTT AAC CCA CTG CAT CCA ATA AGA aat

acc cca gaa ctt att cgc

2、5'-3'

tat tgg atg cag tgg gtt aag caa AGA CCG GGG CAA GGG CTG GAG TGG ATT GGC

taa ata aaa tat aag aca ggc

3'-5'

gcc tgt ctt ata ttt tat tta GCC AAT CCA CTC CAG CCC TTG CCC CGG

TCT ttg ctt aac cca ctg cat cca ata

3、5'-3'

ggg caa ggg ctg gag tgg att ggc CAG CAG TAT YGG TCT ACG CCC CCG TGG ACG

taa ata aaa tat aag aca ggc

3'-5'

gcc tgt ctt ata ttt tat tta CGT CCA CGG GGG CGT AGA CCA ATA CTG

CTG gcc aat cca ctc cag ccc ttg ccc

## 实施例 2 表达抗蓝藻多肽的对照质粒的构建和对照重组抗蓝藻多肽的制备

原始质粒为装载了大肠菌素 Ia 和 Immunity 蛋白基因的 pSELECT-1 质粒(购自 Promega 公司, 上述基因由本实验室装载), 经双链寡聚核苷酸点突变技术(QuickChange™ Kit, Strategene 公司) 将编码抗蓝藻的抗体模拟物的基因(序列表中 SEQ ID NO.4 所述核苷酸序列)插入到大肠菌素 Ia 基因的 I626 位点后, 得到重组质粒 pCHCcyanoMA2 (如图 3 所示), 重组质粒转染入 *E.coli* B834 (DE3) 工程菌里表达制备多肽, 获得序列表如 SEQ ID NO.9 所述的抗蓝藻多肽, 在后续的实施例中称为“抗蓝藻多肽(2)”, 其分子量约 70,000。

制备 pCHCcyanoMA2 质粒的模拟物基因的双链寡聚核苷酸序列按实施例 1 的方法设计。其制备方法同实施例 2。

### 实施例 3 抗蓝藻多肽对铜绿微囊藻的抑制试验结果

#### 试验 (1)

步骤1. 准备试验藻：蓝藻为购自中国科学院水生生物研究所的 FACHB-978 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)。

试验藻的培养方法：将藻种接种到装有250ml BG11培养基的500 ml容积锥形瓶中，置于光照培养箱中。接种初始藻细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL，锥形瓶用透气膜封盖，以防污染。培养温度为 25℃，光照强度为  $(2500 \pm 10\%)$  Lux；光暗比为12h/12h。为减少因光照不均匀可能造成的影响，每隔 2~3 h 摇动并更换各实验组锥形瓶的位置 1 次。自接种的第 5 天起，每隔 24 h 取样、测定 1 次。待藻细胞数密度达到  $10^6$  个/mL数量级左右时，即可开始下一步试验。

步骤2.在五个试管 A、B、C、D、E 中分别加入制备好的蓝藻液 1 ml，然后加入抑制剂：A 空白对照液，B 氨苄青霉素 50  $\mu$ g/ml，C 广谱信息菌素（申请号为 200910092128.4 中公开的 Ph-AM1）50  $\mu$ g/ml，D 抗蓝藻多肽（1）50  $\mu$ g/ml，E 抗蓝藻多肽（2）50  $\mu$ g/ml 后，五个试管置于孵箱中低速振荡培养 12 小时后，都加入吖啶橙（按 50 nM 加入）和碘化丙啶（按 600 nM 加入）孵化 30 分钟，吸取数微升置于载玻片上，荧光显微镜（Nikon 90i, DM505 和 DM565 滤光镜片）观察活蓝藻染色情况。

结果如图 4 所示。结果显示只有抗蓝藻多肽（1）杀伤了培养的铜绿微囊藻。而抗蓝藻多肽（2）、氨苄青霉素、Ph-NM 对所培养的铜绿微囊藻均无作用。

#### 试验 (2)

步骤 1 同试验 (1) 步骤 1。

步骤 2.直接在 6 个接种了试验藻的 500 ml 的锥形瓶中按浓度梯度加入抗蓝藻多肽。铜绿微囊藻加入抗蓝藻多肽的剂量为：0、0.1、0.5、1、5、10  $\mu$ g/ml，每日观察对蓝藻的生长抑制情况。

结果如图 5 所示。由于各处理组所用的抗蓝藻多肽（1）浓度不一样，锥形瓶中铜绿微囊藻液由绿色变成浅黄色之时间快慢与多肽的浓度成正比，然在 72 小时内，肉眼可观察到各处理组均可有效杀灭所试之铜绿微囊藻。

上述结果证明，抗蓝藻多肽（1）具有靶向杀伤蓝藻的效力，而抗蓝藻多

肽 2 几乎无效。

#### 试验 (3)

材料：购自中科院水生生物研究所的 FACHB-417 斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 采用试验 (1) 中步骤 1 的方法培养试验藻。

步骤 2. 直接在 6 个接种了试验藻的 500 ml 的锥形瓶中按浓度梯度加入抗蓝藻多肽 (1)，剂量分别为：0、1、5、10、15、20  $\mu\text{g/ml}$ 。每日观察对栅藻的生长抑制情况。

结果如图 6 所示。虽然加入的抗蓝藻多肽 (1) 剂量相对铜绿微囊藻处理组大了 10 倍，肉眼在试验期间 (190 小时) 未观察到抗蓝藻多肽 (1) 表现出任何对所试栅藻的杀伤作用。

结果如图 6 所示。虽然加入的抗蓝藻多肽 (1) 剂量相对铜绿微囊藻处理组大了 10 倍，肉眼在试验期间 (190 小时) 未观察到抗蓝藻多肽 (1) 表现出任何对所试栅藻的杀伤作用。

#### 试验 (4)

以上试验 (1) ~ (3) 每瓶取 0.1 mL 培养液，置于血球计数板中，在显微镜下观察、计数。图 7 所示的藻细胞计数显示与对照相比较，1  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1) 在 72 小时内即可杀灭所试之铜绿微囊藻。而 1  $\mu\text{g/ml}$  抗蓝藻多肽 (1) 对所试之栅藻几乎无任何作用。

### 实施例 4 . 抗蓝藻多肽对抗铜绿微囊藻、鱼腥藻、小球藻、栅藻的液体培养基试验

所试藻类为购自中科院水生所的铜绿微囊藻、鱼腥藻、小球藻和栅藻。藻类培养和加入处理剂之方法同实施例 3 的试验 (1) 的步骤 1。

取藻细胞数密度达到  $10^6$  个/mL 数量级的培养藻液 40 ml 分装于 300ml 锥形瓶中，各加入 A：加入等量的空白对照液，B：加入抗蓝藻多肽 (1) 35  $\mu\text{g/ml}$ ，继续培养 4 日，观察其生长情况。

结果如图 8 所示。24 小时后，铜绿微囊藻和鱼腥藻藻液颜色开始变浅，至第 4 日藻液已变清亮。而小球藻和栅藻藻液颜色和浊度均无变化。

该结果显示抗蓝藻多肽 1 抑制了所试铜绿微囊藻、鱼腥藻的生长，却不能抑制小球藻、栅藻的生长。

上述结果证明，抗蓝藻多肽（1）具有靶向杀伤蓝藻的效力。

### 实施例 5 抗蓝藻多肽对自然水体中蓝藻的杀灭试验

自然水体采自被蓝藻严重污染的苏州阳澄湖沼虾养殖池，25-35 升分装于 60 x 40 x 30 厘米塑料养殖盆中，每隔 20 分钟气泵送气 10 分钟；加热器自动调温至 27°C，光照强度为  $(2500 \pm 10\%) \text{ lux}$ ；光暗比为 12 h / 12 h，每日采样检测养殖水体 pH、650 nm 光吸收值、叶绿素 a 吸收值（请见图 9）。

将采样液置于可见分光光度计中测定 650 nm 光吸收值（请见图 10）。

利用热乙醇-反复冻融-分光光度法测定叶绿素 a 含量（请见图 10）。用分光

光度计于 665、700 nm 下测其吸光度，计算叶绿素 a 的浓度。其公式为：

$$[\text{Chl}a] = [12.12 (D_{664} - D_{750}) - 1.58 (D_{647} - D_{750}) - 0.08 (D_{630} - D_{750})] \times 10^6 / V \times d.$$

对照组水体中的 pH、650 nm 光吸收值、叶绿素 a 吸收值在试验期间一直居高不下，而抗蓝藻多肽（1）组和硫酸铜组水体的 pH、650 nm 光吸收值、叶绿素 a 吸收值自第二日起即显著下降。

每日采样 30 ml 水样用福尔马林固定后，离心浓缩 10 倍，取 0.1 mL 置于血球计数板中，在显微镜下观察、计数（请见图 11）。镜检中可见在第一天，对照组、抗蓝藻多肽（1）组和硫酸铜组水体中可见大量生长茂盛的鱼腥藻；而自第二日起，抗蓝藻多肽（1）组和硫酸铜组水体中的鱼腥藻大量减少、碎裂；至第五日抗蓝藻多肽（1）组和硫酸铜组水体中已找不到鱼腥藻，而对照组水体中仍见大量鱼腥藻生长。

显微镜检观察藻类形态变化，同时对各种藻类计数以确定养殖水体中浮游植物优势种群的动态变化（请见图 10）。在对照组水体中，鱼腥藻和铜绿微囊藻始终为优势藻种；在抗蓝藻多肽（1）组水体中，鱼腥藻和铜绿微囊藻逐渐减少，小球藻变成为优势藻种；在硫酸铜组水体中，鱼腥藻和铜绿微囊藻逐渐减少，而另一种蓝藻，颤藻变成为优势藻种。

表 1 抗蓝藻多肽处理之浮游植物细胞计数及形态变化（个/升）

|             | 给药当日  | 第二日                            | 第三日                            | 第四日                          | 第五日              |
|-------------|-------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------|
| 对照组         | 32745 | 26363<br>藻形态无变化                | 33194<br>藻形态无变化                | 41068<br>藻形态无变化              | 17954<br>藻形态无变化  |
| 1mg/L 多肽    | 50394 | 43981<br>大多数鱼腥藻变成单细胞或 2-5 个的短链 | 10624<br>鱼腥藻已无长链，多为 1-5 个细胞的短链 | 5370<br>很少量鱼腥藻，多为 1-5 个细胞的短链 | 3432<br>几乎无鱼腥藻细胞 |
| 5mg/L 多肽    | 43987 | 40828<br>同 1mg/L 之变化           | 20744<br>同 1mg/L 之变化           | 9890<br>同 1mg/L 之变化          | 3680<br>几乎无鱼腥藻细胞 |
| 10mg/L 多肽   | 48101 | 41787<br>同 1mg/L 之变化           | 23443<br>同 1mg/L 之变化           | 14214<br>同 1mg/L 之变化         | 4902<br>几乎无鱼腥藻细胞 |
| 20mg/L 多肽   | 45588 | 39194<br>同 1mg/L 之变化           | 33453<br>同 1mg/L 之变化           | 4800<br>几乎无鱼腥藻细胞             | 3508<br>几乎无鱼腥藻细胞 |
| 0.7mg/L 硫酸铜 | 22930 | 1266<br>鱼腥藻全部变成单细胞             | 499<br>藻类几乎都变成有机碎屑             | 305<br>藻类少                   | 379<br>藻类少       |

结果如图 9-11 和表 1 所示。结果显示 0.7 ppm 硫酸铜几乎不加选择的杀伤了所有藻类。而抗蓝藻多肽(1)却能够靶向抑制养殖水体中蓝藻(鱼腥藻、铜绿微囊藻)的生长，而对养殖水体中其他浮游植物的生长基本无影响。

## SEQUENCE LISTING

<110> 畿晋庆三联（北京）生物技术有限公司  
 <120> 抗蓝藻重组抗体多肽及其基因与制备方法  
 <130> PC11853/JJQ  
 <160> 9  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 1878  
 <212> DNA  
 <213> 编码大肠菌素 Ia 的核苷酸序列  
 <400> 1

```

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc ggtgcagaat cgctggggta tgattcagat      60
ggccatgaaa ttatggccgt tgatatatat gtaaacctc cactgtcga tgtcttcat      120
ggtacccgc ctgcatggag ttcttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg      180
gttgatgatt ccccaaccg aagtgatac gaaaaaggg acaaggaaat cacagcgta      240
aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa      300
cgctctctg cggcgattgc tgcaaggga aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt      360
gccggaaacg cagatgccg tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag      420
ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca      480
gagagccgga tgctgtttg tgatgctgat tctcttcgta tatctcccg ggaggccagg      540
tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc      600
gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggatatc tggacaccg gttgtcagag      660
ctggaaaaaa atggcggggc agccctgcc gttctgatg cacaacagge ccgtctgctc      720
gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagttcagtg      780
acggaatgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa      840
cagaaaaaca cgctgacgg caaacgata gttccctg aaaaattccc ggggcgttca      900
tcaacaatc attctattgt tgtgagcgg gatccgagat ttgccgtac gataaaaatc      960
acaaccagcg cagtcatga taacctgca aacctgaatt atctctgag ccattccgg      1020
ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtagaca ggatgtggaa      1080
gggtacaaga aaattataa tgctgaagt gctgaatggg ataagttac gcaaagattg      1140
cttgatgcca gaaataaat cacctctgct gaatctcgg taaatcggc gagaataac      1200
ctcagtcca gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctctaatgc cctgttgaag      1260
gaaaaagaga atatacgtaa ccagcttcc ggcataatc agaagatagc ggaagagaaa      1320
agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta attcacaac agagttcctg      1380
aatcagttt cagaaaaata tggcgaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg      1440
caggctaaag ggaagaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaacgta tgaaaagtac      1500
cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccct      1560
gagtctgtga agctgtctga tatacgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga      1620
tatgcaggaa aatttacaag tcttgctgac tggatcactg agtttggtaa ggctgtccgg      1680
acagagaact ggcgtcctct tttgtttaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca      1740
acggctcttg tggcactggg ctacagtatt ctaccggaa gcgcttagg cattatcggg      1800
tatggtttac tgatggctgt caccggtcg ctgattgat aatcgctgt ggaaaaagcg      1860
aataagttct ggggtatt

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 87

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 抗铜绿微囊藻表面抗原抗体模拟物基因

&lt;400&gt; 2

tcctattgga tgcagtgggt taagcaaaga ccggggcaag ggctggagtg gattggccag 60

cagtattggt ctacgccgcc gtggacg 87

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 抗铜绿微囊藻表面抗原抗体模拟物的氨基酸序列

&lt;400&gt; 3

Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu

1 5 10 15

Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr

20 25

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 87

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; VHCDR1 N-C 序列颠倒之抗铜绿微囊藻表面抗原抗体模拟物的基因

&lt;400&gt; 4

cagatgtggt attcttgggt taagcaaaga ccggggcaag ggctggagtg gattggccag 60

cagtattggt ctacgccgcc gtggacg 87

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; VHCDR1 N-C 序列颠倒之抗铜绿微囊藻表面抗原抗体模拟物氨基酸序列

&lt;400&gt; 5

Gln Met Trp Tyr Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu

1 5 10 15

Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr

20 25

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1965

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 编码抗蓝藻多肽 1 核苷酸序列

&lt;400&gt; 6

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc ggtgcagaat cgctggggta tgattcagat 60

ggccatgaaa ttatggccgt tgatattat gtaaaccctc cacgtgtcga tgtcttcat 120  
 ggtaccccg ctcgatggag ttcttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg 180  
 gttgatatt ccccaaccg aagtgatatc gaaaaaagg acaaggaaat cacagcgta 240  
 aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa 300  
 cgctctctg cggcgattgc tgcaaggga aaagatgaaa acacactgaa aacactcgt 360  
 gccggaacg cagatgccg tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag 420  
 ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca 480  
 gagagccgga tgcgtttg tgatgctgat tctcttcgta tatctcccc ggaggccagg 540  
 tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc 600  
 gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggatc tggacacccg gttgtcagag 660  
 ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgc gttctgatg cacaacaggc ccgtctgctc 720  
 gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcaggagccc ggaataaact cagttcagt 780  
 acggaatgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa 840  
 cagaaaaaca cgctgacgg caaacgata gttccctg aaaaattccc ggggcgttca 900  
 tcaacaatc attctattg ttgtagcgg gatccgagat ttgccgtac gataaaaatc 960  
 acaaccagcg cagtcacga taaccgtgca aacctgaatt atctctgag ccattccgg 1020  
 ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccg tggtagacaga ggalgtggaa 1080  
 ggtgacaaga aaattataa tgcgaagtt gctgaatggg ataagttac gcaaagattg 1140  
 ctgatgcca gaaataaat cacctctgct gaatctgcgg taaatccggc gagaataaac 1200  
 ctcatgcca gaacaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctctaatgc cctgttgaag 1260  
 gaaaaagaga atatacgtaa ccagcttcc gccatcaatc agaagatagc ggaagagaaa 1320  
 agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta attcacaac agagttcctg 1380  
 aatcagttt cagaaaaata tggcgcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg 1440  
 caggctaaag ggaagaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaacgta tgaagatgac 1500  
 cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt 1560  
 gactctgta agctgtctga tatatctct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620  
 tatgcaggaa aatttacaag tctgtctgac tggatcactg agtttggtaa ggctgtccgg 1680  
 acagagaact ggcgtcctct tttgttaaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740  
 acggctcttg tggcactggt cttcagtatt cttaccggaa gcgcttagg cattatccgg 1800  
 tatggttac tgatggctgt caccggtgcg ctgattgatg aatcgttgt ggaaaaagcg 1860  
 aataagtctt ggggtattc ttattgatg cagtgggta agcaaagacc ggggcaaggg 1920  
 ctggagtggg ttggccagca gtattgtct acgcccgct ggacg 1965

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 654

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 抗蓝藻多肽 1 氨基酸序列

&lt;400&gt; 7

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Gly Ala Glu Ser Leu Gly Tyr

1 5 10 15

Asp Ser Asp Gly His Glu Ile Met Ala Val Asp Ile Tyr Val Asn Pro

20 25 30

Pro Arg Val Asp Val Phe His Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe

35 40 45

Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro  
 50 55 60  
 Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys  
 65 70 75 80  
 Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu  
 85 90 95  
 Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu  
 100 105 110  
 Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Ala Asp Ile  
 115 120 125  
 Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly  
 130 135 140  
 Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg  
 165 170 175  
 Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala  
 180 185 190  
 Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg  
 195 200 205  
 Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly  
 210 215 220  
 Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu  
 245 250 255  
 Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg  
 260 265 270  
 Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr  
 275 280 285  
 Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser  
 290 295 300  
  
 Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr  
 305 310 315 320  
 Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser  
 325 330 335  
 His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro  
 340 345 350  
 Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu  
 355 360 365  
 Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn  
 370 375 380

Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu  
 385 390 395 400  
 Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala  
 405 410 415  
 Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn  
 420 425 430  
 Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr  
 435 440 445  
 Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu  
 450 455 460  
 Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln  
 465 470 475 480  
 Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr  
 485 490 495  
 Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg  
 500 505 510  
 Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser  
 515 520 525  
 Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe  
 530 535 540  
 Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr  
 545 550 555 560  
 Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly  
 565 570 575  
 Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly  
 580 585 590  
 Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly  
 595 600 605  
 Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly  
 610 615 620  
 Ile Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 625 630 635 640  
 Glu Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr  
 645 650

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1965

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 编码抗真菌多肽 2 核苷酸序列

&lt;400&gt; 8

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc ggtgcagaat cgctggggta tgattcagat 60  
 ggccatgaaa ttatggccgt tgatatttat gtaaaccctc cagtggtcga tgtcttcat 120  
 ggtacccgcg ctgcatggag ttcttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg 180

gttgatgatt ccccaacccg aagtgatatc gaaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtag 240  
 aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa 300  
 cgcctctctg cggcgattgc tgcaagggaa aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt 360  
 gccggaaacg cagatgccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag 420  
 ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca 480  
 gagagccgga tgctgtttgc tgatgctgat tctcttcgta tatctcccc ggaggccagg 540  
 tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc 600  
 gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggtattc tggacacccg gttgtcagag 660  
 ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttcttgatg cacaacaggc ccgtctgctc 720  
 gggcagcaga cagggaatga cagggccatt tcagagggcc ggaataaact cagttcagtg 780  
 acggaatcgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa 840  
 cagaaaaaca cgcctgacgg caaacgata gtttcccctg aaaaattccc ggggcgttca 900  
 tcaacaatc attctattgt tgtgagcggg gatccgagat ttgccggtac gataaaaatc 960  
 acaaccagcg cagtcacga taaccgtgca aacctgaatt atctctgag ccattccggt 1020  
 ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtagacaga ggatgtggaa 1080  
 ggtgacaaga aaattataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg 1140  
 ctgatgccca gaaataaat cacctctgct gaatctgcgg taaatcggc gagaataaac 1200  
 ctcatgtcca gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgtgaag 1260  
 gaaaaagaga atatacgtaa ccagcttcc ggcatcaatc agaagatagc ggaagagaaa 1320  
 agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta attcacaac agagttcctg 1380  
 aatcagttt cagaaaaata tggcgcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg 1440  
 caggctaaag ggaagaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaacgta tgaagagtag 1500  
 cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt 1560  
 gagtctgtga agctgtctga tatatctct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620  
 tatgcaggaa aatttacaag tcttgctgac tggatcactg agtttggtta ggctgtccgg 1680  
 acagagaact ggcgtctct tttgttaaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740  
 acggctcttg tggcactggt cttcagtatt cttaccggaa gcgctttagg cattatcggg 1800  
 tatggtttac tgatggctgt caccggtgcg ctgattgatg aatcgcttg gaaaaagcg 1860  
 aataagtctt ggggtattca gatgtggtat tcttgggta agcaaagacc ggggcaaggg 1920  
 ctggagtggg ttggccagca gtattggtct acgcccggt ggacg 1965

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 654

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 抗蓝藻多肽 2 氨基酸序列

&lt;400&gt; 9

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Gly Ala Glu Ser Leu Gly Tyr

1 5 10 15

Asp Ser Asp Gly His Glu Ile Met Ala Val Asp Ile Tyr Val Asn Pro

20 25 30

Pro Arg Val Asp Val Phe His Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 35                                                              | 40  | 45  |     |
| Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro |     |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu |     |     |     |
| 85                                                              | 90  |     | 95  |
| Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu |     |     |     |
| 100                                                             | 105 |     | 110 |
| Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Ala Asp Ile |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg |     |     |     |
| 165                                                             | 170 |     | 175 |
| Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala |     |     |     |
| 180                                                             | 185 |     | 190 |
| Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu |     |     |     |
| 245                                                             | 250 |     | 255 |
| Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg |     |     |     |
| 260                                                             | 265 |     | 270 |
| Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |
| Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser |     |     |     |
| 325                                                             | 330 |     | 335 |
| His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro |     |     |     |
| 340                                                             | 345 |     | 350 |
| Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu |     |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |     |
| Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn |     |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |     |

Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu  
 385 390 395 400  
 Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala  
 405 410 415  
 Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn  
 420 425 430  
 Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr  
 435 440 445  
 Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu  
 450 455 460  
 Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln  
 465 470 475 480  
 Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr  
 485 490 495  
 Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg  
 500 505 510  
 Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser  
 515 520 525  
 Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe  
 530 535 540  
 Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr  
 545 550 555 560  
 Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly  
 565 570 575  
 Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly  
 580 585 590  
 Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly  
 595 600 605  
 Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly  
 610 615 620  
 Ile Gln Met Trp Tyr Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 625 630 635 640  
 Glu Trp Ile Gly Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Pro Trp Thr  
 645 650

## 权利要求书

1. 杂交瘤细胞，其保藏号为：CGMCC No.4783。
2. 权利要求 1 所述的杂交瘤分泌的单克隆抗体。
3. 具有蓝藻识别结合能力的模拟抗体多肽，是权利要求 2 所述的单克隆抗体的抗原结合片段，或根据所述抗原结合片段上的功能区域设计然后人工表达分离而得的小分子多肽。
4. 根据权利要求 3 所述的模拟抗体多肽，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。
5. 编码权利要求 3 或 4 的模拟抗体多肽的基因。
6. 根据权利要求 5 所述的基因，核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。
7. 抗蓝藻重组抗体多肽，由权利要求 3 或 4 所述的具有蓝藻识别结合能力的模拟抗体多肽可操作地线性连接在大肠菌素多肽的羧基端构成，所述大肠菌素选自大肠菌素 E1, Ia, Ib, A, B 或 N。
8. 根据权利要求 7 所述的抗蓝藻重组抗体多肽，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示。
9. 编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因。
10. 根据权利要求 9 所述的编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因，核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。
11. 含有编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因的重组表达载体。
12. 权利要求 7 或 8 所述的抗蓝藻重组多肽的制备方法，其步骤如下：将编码抗蓝藻重组抗体多肽的基因导入到大肠杆菌表达系统中，培养转化的大肠杆菌，然后分离大肠杆菌表达的多肽。
13. 权利要求 7 或 8 所述的抗蓝藻重组抗体多肽在治理水体过度营养化中的应用。