

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(5):670-675; 4 May 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

抗对硫磷基因工程新型抗体的制备及鉴定

乔亚奇^{1,2}, 潘家荣^{1*}, 王磊¹, 于海英², 陈明², 张维^{2*}, 张付凯¹

(¹ 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193)

(² 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要:【目的】提高抗对硫磷抗体的亲和力以提高酶联免疫检测的灵敏度。【方法】本研究通过抗对硫磷单链抗体基因和核心链霉亲和素基因片段的拼接重组, 获得了抗对硫磷单链抗体-核心链霉亲和素融合基因 (*scfv-sa*), 并将该融合基因 (*scfv-sa*) 插入到表达载体 *pET28a(+)* 中, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行原核表达, 制备融合蛋白。SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定 *scfv-sa* 的表达, Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱纯化融合蛋白, 并用 ELISA 方法测定该融合抗体的亲和力。【结果】结果表明, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中该融合基因能表达出分子量约为 46 kDa 的融合蛋白, 形成了四价结构域-四价聚合抗体。ELISA 测定结果表明该抗体能与对硫磷特异结合, 抗体效价在 $1:1 \times 10^6$ 以上, 亲和常数为 $4.25 \times 10^7 \text{ L/mol}$ 。【结论】制备的抗对硫磷四价聚合抗体能与抗原特异结合, 与单克隆抗体相比, 抗原结合位点显著增加, ELISA 检测灵敏度显著提高。

关键词: 对硫磷; 链霉亲和素; 四价抗体; 原核表达

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 05-0670-06

对硫磷 (O, O-二乙基-O-(4-硝基苯基) 硫代磷酸酯) 为广谱杀虫剂, 属高毒农药, 因对水体、土壤等环境造成的危害大而被众多国家所禁用。2002 年我国规定在蔬菜、果树、茶叶、中草药材上不得使用 and 限制使用对硫磷, 2007 年 1 月 1 日《中华人民共和国农业部公告》(第 322 号) 明令禁止销售。然而在国内食品农残检测和国际食品贸易中, 对硫磷残留仍然是必检项目。目前, 对硫磷检测方法有很多^[1], 主要采用国家标准规定的色谱法 GB13192-91 和 GB/T5009.20-1996, 分别为水质有机磷农药的测定和食品中有机磷农药残留量的测定方法。色谱检测法存在前处理复杂、操作繁琐、试剂消耗量大、设备昂贵等缺点^[2], 更不能用于快速检测。而基于抗原-抗体特异性结合反应为基础的免疫分析方法具有简便快速、灵敏度高、特异性强等优点, 逐渐成为农药残留检测 (或筛选) 的重要手段^[3]。但是, 传统

的多克隆抗体和杂交瘤单克隆抗体制备时间长, 对于小分子半抗原, 难于得到高亲和力、高效价的抗体^[4]。因此, 获得高特异性和强亲和力的抗体是小分子半抗原免疫分析方法的关键^[5]。利用基因工程技术对编码抗体的基因按需要进行加工改造和重新装配, 可以创造出新型、多价抗体, 亲和力和效价进一步提高^[6]。目前基因工程抗体制备技术已经逐渐成熟^[7], 制备多价抗体的方法也有很多报道。如在单链抗体重链 V_H 和轻链 V_L 之间连接适当的连接肽形成单链抗体 (single chain variable fragment, *scfv*), 可以通过改变连接肽长短形成多价聚合体, 或者通过链内或链间非共价键结合形成多价抗体分子, 或者通过寡聚化的结构域来介导多价抗体的形成, 可有效提高其亲和力、效价和特异性。本实验室已经获得了原核表达的抗对硫磷单链抗体^[8], 但稳定性较差。本研究拟将抗对硫磷单链抗体基因与核

基金项目: 国家高技术研究发展计划课题 (2006AA10Z449)

* 通信作者。潘家荣, Tel: +86-10-62815875, E-mail: panjr@263.com; 张维, +86-10-82106106, zhwm@caas.net.cn

作者简介: 乔亚奇 (1983-) 男, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向为食品安全检测技术。E-mail: qiaoyaqi2003@163.com

收稿日期: 2009-12-23; **修回日期:** 2010-03-08

心链霉亲和素基因拼接, 构建表达载体, 实现原核表达, 利用核心链霉亲和素的体内自聚合特性^[9], 形成稳定的高亲和力、高效价的抗对硫磷融合抗体, 并对其抗原结合活性进行鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

抗对硫磷单链抗体基因 *scfv* 由本实验室设计, 送由上海生工生物工程技术有限公司合成, 以质粒的形式提供 (HF392-*scfv*)。核心链霉亲和素基因由北京擎科生物有限公司合成, 以质粒的形式提供 (pGH-*sa*)。表达载体 pET28a (+) 和大肠杆菌 TRANS10 由中国农业科学院生物技术研究所实验室保存。大肠杆菌 BL21 (DE3) 购自 Novagen 公司。鼠抗 Anti-His 抗体、羊抗鼠 IgG - HRP 及沉淀型单组分 TMB 底物溶液购于天根公司。常用限制性内切酶、DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶和 DNA Marker 购自 TaKaRa 生物技术 (大连) 有限公司。M-MLV 反转录酶和 RNA 酶抑制剂购自 Promega 公司。蛋白分子量标准 Marker 购自 Fermentas 公司。质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒购自 Omega 公司, 引物由北京擎科生物有限公司合成。

1.2 引物设计

根据抗对硫磷单链抗体基因和核心链霉亲和素基因序列, 分别设计出对应 2 对引物。引物 *sc5F* (5'-GGGAATTCCATATGCAGGTGCAACTGCAGGAGTC-3') 和 *sc3R* (5'-TTCAGCCGCACCGGATCCCCGTTTGATTTCCAGCTTG-3') 用于扩增抗对硫磷单链抗体基因; 引物 *sa5F* (CGGGATCCGGTGC GGCTGAA GCAGGTATCACCGGC-3') 和 *sa3R* (5'-CCGCTCGAGGGAGGCGCGGACGGCTT-3') 用于扩增核心链霉亲和素基因。下划线部分分别为引入的 *Nde*I 和 *Xho*I 酶切位点。

1.3 抗对硫磷单链抗体基因和核心链霉亲和素基因的拼接及表达载体的构建

分别以含有抗对硫磷单链抗体基因的质粒 pUC57-*scfv* 和含有核心链霉亲和素基因的质粒 pGH-*sa* 为模板, 用 *sc5F*、*sc3R* 和 *sa5F*、*sa3R* 两对引物扩增抗对硫磷单链抗体基因和核心链霉亲和素基因。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 循环扩增 30 次; 72℃ 延伸 10 min。并对 PCR 产物进行胶回收。

以 2 种 PCR 回收产物为模板, 以 *sc5F* 和 *sa3R* 为引物, 采用重叠延伸 PCR^[10-12] 将抗对硫磷单链抗

体基因和核心链霉亲和素基因拼接为重组基因^[13], 命名为 *sc-sa* 基因。经 *Nde*I 和 *Xho*I 酶切后, 连接到表达载体 pET-28a (+) 上, 转化到大肠杆菌 TRAN10 中, 在卡那霉素 (Km) 平板上筛选出阳性重组质粒, 并测定克隆片段的 DNA 序列, 进行验证。

1.4 融合基因的表达和 SDS-PAGE 检测

将阳性重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中^[14], 挑取单菌落于 20 mL LB 液体培养基中 37℃ 摇菌培养 7-12 h 后, 稀释 (1:100) 到新鲜的 LB 液体培养基中, 37℃ 恒温摇床振荡培养, 至 OD₆₀₀ 达 0.5-0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 12℃ 诱导培养 3-4 h。收集菌体, 重悬后加溶菌酶裂解, 超声波破碎细胞, 用 12% SDS-PAGE 电泳检测表达结果。

1.5 蛋白的 Western blot 检测及亲和纯化^[15]

分别取上清和沉淀用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳后电转到 PVDF 膜上进行 Western 印迹, 对表达产物进行检测。5% 脱脂奶粉封闭后, 用鼠抗 His-tagged 抗体为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, ECL 显色。如上述方法诱导表达重组蛋白, 用金属离子层析的方法 Ni-NTA 纯化可溶性表达蛋白, 用 SDS-PAGE 检测蛋白的分布。紫外分光光度法粗测定蛋白浓度。

1.6 融合抗体的 ELISA 反应活性测定^[16]

用 10 μg/mL 对硫磷包被原 (对硫磷-OVA 连接物, 本实验室制备) 包被酶标板, 每孔 100 μL, 4℃ 孵育过夜, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 用 PBST + 2% 的明胶封闭 2 h, 把待测蛋白倍比稀释, 洗板后加入, 每孔 100 μL, 每个浓度 3 个重复, 以转化空质粒的菌株细胞粗提液作为阴性对照。37℃ 孵育 2 h, 洗板, 加入 1:1000 稀释的鼠源抗组氨酸抗体, 37℃ 孵育 2 h 后加入 1:800 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP, 每孔 100 μL, 37℃ 孵育 2 h, 洗板后加底物于 37℃ 显色, 用 2 mol/L 的硫酸作为终止液, 终止显色后在波长 450 nm 测定吸光值。

采用 beatty 等建立的间接非竞争 ELISA 的方法^[17], 确定抗原最适包被量, 分别以 5、2.5、1.25 和 0.625 mg/L 浓度的对硫磷-OVA 联接物包板, 用 PBS 稀释融合抗体浓度至 5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125、0.039063 μg/mL。同 1.6 上述方法, 测定波长 450 nm 吸光值。分析抗体稀释度和 A₄₅₀ 关系, 作抗体与对硫磷结合的反应曲线, 并计算抗对硫磷融合抗体的亲和常数。以本实验室制备的对硫磷单克隆抗体^[18] 做对照, 用 ELISA 方法测定

亲和常数, 比较与该融合蛋白的差异。

2 结果和分析

2.1 PCR 扩增出抗硫磷单链抗体基因和链霉亲和素基因

以 *sc5F*、*sc3R* 为引物, 质粒 pUC57-*scfv* 为模板, 扩增单链抗体基因; 同时以 *sa5F*、*sa3R* 为引物, pGH-*sa* 为模板扩增链霉亲和素基因, 分别扩增出大小约为 730 bp 和 380 bp 的 2 条基因片段(图 1), 和预期结果(单链抗体基因片段 729 bp 和链霉亲和素基因片段 384 bp 相符)。

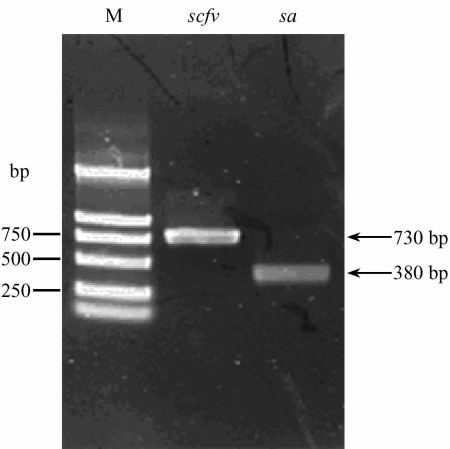


图 1 *scfv* 和 *sa* 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 The results of PCR amplification of *scfv* and *sa*.

2.2 重叠延伸法拼接融合基因

将 2.1 扩增出来的 2 条基因片段(730 bp 和 380 bp) 经重叠延伸 PCR 方法拼接后得大小约 1.2 kb 的片段(图 2 - A), 这与预期大小相符, 说明 *scfv* 和 *sa* 融合基因拼接成功。将该片段经回收纯化后, 克隆、转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 提取并筛选出大小为 1.2 kb 重组质粒后, 用 *Nde* I 和 *Xho* I 对质粒进行酶切验证, 结果得到大小为 5300 bp 和 1200 bp 左右 2 个条带(图 2-B), 前者与 pET-28a (+) 空载体大小相符合, 后者恰好为目的基因片段大小, 进一步说明融合基因拼接成功。

实验还对重组质粒进行了测序, 并用 DNAMAN 软件进行分析, 结果发现插入片段全长 1122 bp, 包括预期的 *scfv* 基因、*sa* 基因和中间的连接肽的核苷酸序列, 这表明构建的融合基因正确插入到载体中。同时测序结果发现, 在第 740 位有一个核苷酸产生了突变(由 T 突变为 G), 即密码子由 GCT 变为 GCG, 但不影响其编码氨基酸序列。

2.3 融合抗体的表达和初步检测

融合抗体表达载体的简单示意图见图 3。将重组的表达载体和 pET-28a (+) 空载体分别转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 后, 挑取单克隆转化菌进行 IPTG 诱导表达。12% 的 SDS-PAGE 电泳分析全细胞蛋白发现, 重组质粒的菌株特异性表达出一条相对分子量约为 46 kDa 的蛋白(图 4-A), 与理论计算

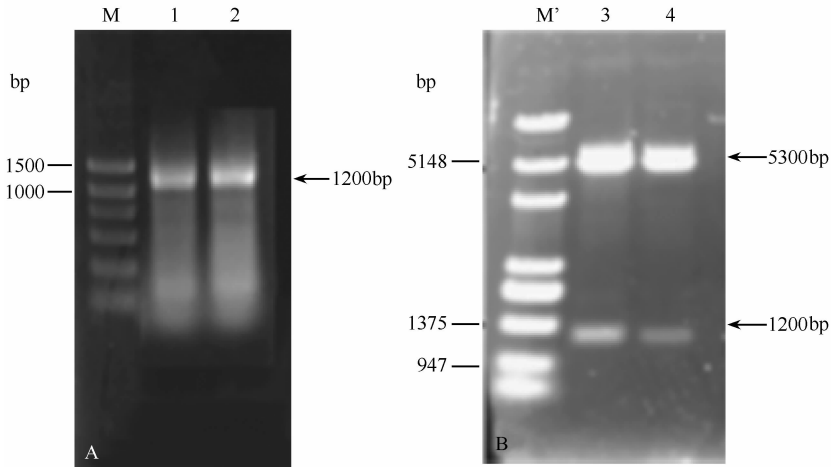


图 2 *scfv* 和 *sa* 的拼接重组质粒(A) 及酶切(B) 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of the recombinant plasmid of *scfv-sa* (A) and its enzymatic digestion. 1, 2: recombinant of *scfv-sa*; 3, 4: enzymatic digestion of recombinant plasmid.

值符合, 而 pET-28a (+) 空质粒的全细胞蛋白电泳中没有相应的蛋白条带。Western blot 结果显示, 鼠抗 His 抗体仅与此 46 kDa 的诱导表达产物反应, 而与其他条带均无反应(图 4-B), 从而证明此蛋白即

为目的蛋白。

由图 4-B 中可以看出, 表达后上清中可溶性蛋白的含量很少, 主要以包涵体的形式存在于沉淀中。通过对可溶性蛋白最佳形成条件进行探索发现, 该

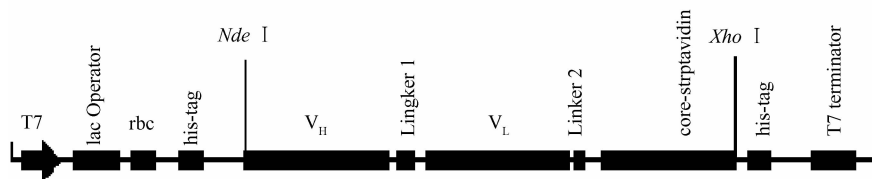


图3 重组抗体表达载体结构简图

Fig. 3 Schematic diagram of expression vector of recombinant antibody.

融合蛋白在 0.1 mmol/L IPTG 诱导后, 15°C 的低温条件下, 诱导 3 h, 形成较多的可溶性蛋白, 但大部分蛋白仍以包涵体形式存在。

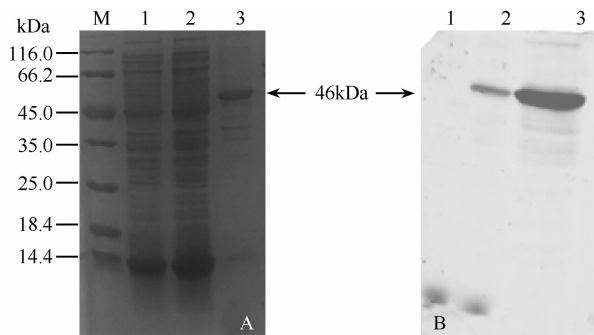


图4 对硫磷重组抗体的 SDS-PAGE (A) 和 Western Blot (B) 结果

Fig. 4 SDS-PAGE Analysis (A) and Western blot (B) of the expressed product of the recombinant antibody. M; Protein Marker; 1; BL21 (DE3) crude lysate containing the pET28a (+); 2, 3; BL21 (DE3) crude lysate containing the pET-teab.

2.4 融合抗体的 ELISA 反应活性鉴定

用 ELISA 方法检测融合蛋白抗原结合活性和特异性, 以空质粒作阴性对照。结果显示此融合蛋白与对硫磷呈阳性反应, 在 450 nm 波长下其抗原抗体反应的吸光值为 1.088 ± 0.080 ; 而加非相关抗体的对照孔均呈阴性反应, 其 $A_{450 \text{ nm}}$ 值仅为 0.250 ± 0.080 。

间接非竞争 ELISA 测定的抗原抗体反应曲线

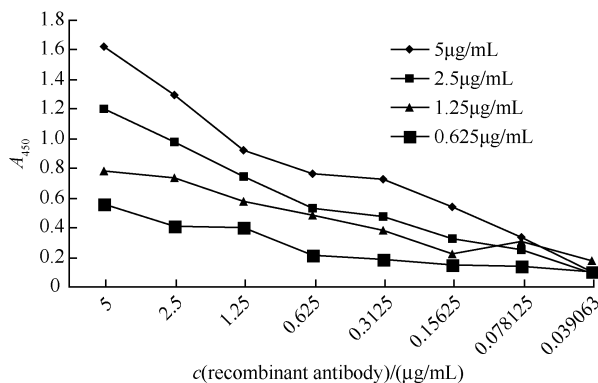


图5 融合抗体与对硫磷结合的反应曲线

Fig. 5 Binding activity of recombinant antibody with parathion.

(图 5), 结果表明该融合抗体能与对硫磷发生特异性结合。根据公式 $K = (n - 1) / 2 (nAb' - Ab)$ 计算亲和常数, 式中 Ab 和 Ab' 分别表示当抗原浓度为 Ag 和 Ag' 时, 产生半数吸光值的抗体浓度 (mol/L), $n = Ag / Ag'$ 。测定抗体效价 $1:1 \times 10^6$ 以上, 计算亲和常数 4.25×10^7 L/mol。本实验室制备的单克隆抗体亲和常数为 1.6×10^5 L/mol。经极差 t 检验, $|t| < t_{0.975}$ 有显著性差异, 说明该融合抗体显著优于单克隆抗体。

3 讨论

免疫分析法在农药残留快速检测中具有简便快速、灵敏度高、特异性强等特点, 其关键是制备高亲和力、高效价的特异抗体。对小分子半抗原农药而言, 传统的抗体制备过程需要有机合成针对农药的特异结构的免疫原, 有机合成过程长、难度大, 在一定程度上为抗体的制备增加了困难, 故传统抗体制备技术难以得到高亲和力、高效价的抗体。基因工程抗体制备, 可省去复杂的有机合成步骤, 可人为对抗体进行修饰, 只保留其具有生物学活性的结构, 提高其特异性结合反应位点和亲和力。同时, 基因工程抗体设计制备成功后, 仅需保存其基因序列, 随时合成表达出所需抗体, 省去了传统抗体高要求的保存方法。

链霉亲和素 (sa) 是一种糖蛋白, 是由 *Streptomyces avidin* 菌在培养过程中分泌的一种蛋白产物, 分子量为 6.5 kDa, 由 4 条序列相同的肽链构成, 每条 sa 肽链可以结合 1 个生物素分子, 每个 sa 分子具有 4 个可与生物素分子结合位点。把单链抗体融合到链霉亲和素的亚基上, 由于链霉亲和素具有自身聚合形成四聚体功能, 可形成四价结构域, 每价结构域含有一个抗原抗体结合位点, 即形成四价结构的抗体。对单位抗体蛋白而言, 四价抗体与普通抗体分子相比, 具有更多的抗原抗体结合位点, 抗体效价提高。同时亲和力也通过个体亲和力的叠加作用而增强, 从而形成具有更高亲和力的对硫磷四价抗体。本研究以对硫磷单链抗体为研究对象, 将

其和链霉亲和素形成融合的复合物,经酶联免疫反应验证融合蛋白可以特异性识别对硫磷抗原,并具有较高的效价和亲和力,为进一步制备多价高亲和力抗体提出一种新的思路和途径。

在 *E. coli* 细胞中表达的融合蛋白大部分以不溶性聚合物(包涵体)存在,只有在强变性条件(6 M GuHCl)下才能被解离,复性后的蛋白生物活性极大降低甚至完全丧失活性,因此有效的复性方法有待研究。同时,本实验获得的工程抗体与普通抗体相比,灵敏度有所提高,但与预想值相比还有一定距离,其原因有待进一步研究。

该技术制备四价抗体,省去了传统抗体制备中人工合成半抗原、免疫动物等繁琐过程,便于抗体的大规模生产;借助于天然存在的链霉亲和素做骨架,稳定性好,与其他多价抗体制备方法相比,操作更简单。同时,本方法制备的多价高亲和力抗体与传统抗体相比,亲和力显著提高,可大幅度提高 ELISA 检测灵敏度。该技术的建立不仅为改造如农药、兽药和生物毒素等半抗原抗体,提高检测灵敏度提供了新的思路,同时为制备稀有抗体、多价抗体和多特异性抗体提供了参考。

参考文献

- [1] 王华,熊汉国,潘家荣. 有机磷农药残留快速检测方法研究进展. *中国公共卫生* (*Chinese Journal of Public Health.*), 2007, 23(4): 500-501.
- [2] 刘晓颖,吴飞,吴杭. 蔬菜中有机磷农药残留的高效液相色谱分析. *生物学杂志* (*Journal of Biology*), 2004, 21(6): 41-42.
- [3] 曾艳红,辛焕发. 常用农药残留快速检测方法及注意事项. *农业技术与装备* (*Agricultural Technology & Equipment*), 2009, 12: 31-32.
- [4] 吕学东,甄宏太,李平,潘荣生,周洪斌. 出口大米中对硫磷残留量免疫学快速检测方法的研究. *检验检疫科学* (*Inspection and Quarantine Science*), 2002, 12(2): 16-19.
- [5] 王文珺,刘兴春,李季. 免疫分析在农药残留检测中的应用和发展. *中国生态农业学报* (*Chinese Journal of Eco-Agriculture*), 2007, 11: 195-198.
- [6] 杨卫东. 用基因工程技术制备多价微型抗体的研究. *国外医学·放射医学核医学分册* (*Foreign Medical Sciences*), 1999, 23(2): 62-65.
- [7] 操敏. 基因工程双功能抗体的分子设计及表达. *国外医学·免疫学分册* (*Foreign Medical Sciences*), 2000, 23(5): 298-302.
- [8] 宋丽敏,张维,林敏,潘家荣. 抗对硫磷基因工程抗体 *scfv* 的制备及其初步鉴定. *核农学报* (*Journal of Nuclear Agricultural Sciences*), 2008, 22(6): 856-859.
- [9] Kathy Miller, Gloria Meng, Jun Liu, Amy Hurst, David Lawrence, Wai-Lee Wong, Laura DeForge, Steven Sherwood, Leonare Presta, Vanessa Hsei, Rene Ekert, Gilbert Keller. Design, Construction, and In Vitro Analyses of Multivalent Antibodies. *The Journal of Immunology*, 2003, 170: 4854-4861.
- [10] 徐芳,姚泉洪,熊爱生,彭日荷,侯喜林,曹兵. 重叠延伸 PCR 技术及其在基因工程上的应用. *分子植物育种* (*Molecular Plant Breeding*), 2006, 4(5): 747-750.
- [11] 王宝利,梁晖,戴芳,郭刚,张镜宇. 重叠延伸 PCR 法在合成人骨保护素 N 端编码序列中的应用. *天津医科大学学报* (*Journal of Tianjin Medical University*), 10(3): 343-345.
- [12] 杨宇,吴元华,郑雅楠. 利用重叠延伸 PCR 技术进行 DNA 的人工合成. *安徽农业科学* (*Journal of Anhui Agricultural Sciences*), 2006, 34(9): 1810-1811.
- [13] S. Dubel, F. Breitling, R. Kontermann, T. Schmidt, A. Skerra, M. Little. Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibody (*scfv*). *Journal of Immunological Methods*. 1995, 178: 201-209.
- [14] Brandon Leonard, Vikram Sharma, Vaughn Smider. Co-expression of antibody fab heavy and light chain genes from separate evolved compatible replicons in *E. coli*. *Journal of Immunological Methods*, 2006 (317): 56 - 63.
- [15] Towbin H. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76: 4350-4354.
- [16] 陈飞,邵景东. 伏马菌素 B1 间接竞争 ELISA 检测方法的建立和应用. *江苏农业科学* (*Jiangsu Agricultural Sciences*), 2007, 6: 278-281, 350.
- [17] Beatty JD, BeattyBG, VhahosWG. Measurement of monoclonal anti-body affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 1987, 100(1-2): 173-179.
- [18] 许园园,吴雅欣,潘家荣. 对硫磷单克隆抗体的制备及鉴定. *核农学报* (*Journal of Nuclear Agricultural Sciences*), 2008, 22(6): 856-859.

Construction and identification of genetically engineered tetravalent antibodies against parathion

Yaqi Qiao^{1,2}, Jiarong Pan^{1*}, Lei Wang¹, Haiying Yu², Min Chen², Wei Zhang^{2*}, Fukai Zhang¹

(¹ Institute of Agro – food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

(² Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: [Objective] The objective was to improve the affinity of antibody against parathion with an aim to enhance the sensitivity of ELISA assay. [Methods] We recombined anti-parathion single-chain variable fragment gene (*scfv*) and the core streptavidin gene (*sa*) to produce an anti-parathion single-chain variable fragment-core of streptavidin-biotin fusion gene (*scfv-sa*), and inserted the fusion gene (*scfv-sa*) into the vector pET28a (+) in *E. coli* BL21 for transformation by prokaryotic expression. The expression was analyzed with SDS-PAGE and Western blot. the affinity of the recombinant protein was measured by ELISA after purified by metal affinity chromatography using Ni-NTA. [Results] The recombinant gene could express a fusion protein about 46 kDa, which formed a tetravalent domain, tetravalent antibody. ELISA results showed that the tetravalent antibody could bound to parathion specifically with the Affinity constant of 4.25×10^7 L/mol and titer of over $1:1 \times 10^6$. [Conclusion] The recombining anti-parathion tetravalent antibody could react with parathion specifically with significantly more binding sites with the monoclonal antibody, based on which the detection sensitivity of ELISA would be improved.

Keywords: parathion; core streptavidin; tetravalent antibodies; prokaryotic expression

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China(2006AA10Z449)

* Corresponding authors. Jiarong Pan; Tel: +86-10-62815875; Fax: +86-10-62815875; E-mail: panjr@263.com; Zhang Wei; Tel: +86-10-82106106; Fax: +86-10-82106106; E-mail: zhwm@caas.net.cn

Received: 23 December 2009 / Revised: 8 March 2010

《微生物学报》投稿方式

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿: 请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿, 请先进行“注册”, 注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿, 则可直接投稿。如果忘了用户名和密码, 请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执: 编辑部看到远程投稿后, 当日或者次日给作者发“收稿回执”, 通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审: 编辑看到远程投稿后, 还要对稿件进行内审。内审会有2个结果, 直退或受理, 请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 邮寄纸样: 为了保护知识产权, 务必请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板); 为了核实文中的图、表等内容, 还需要提供一份纸质稿件。
- (5) 受理费: 100元审稿费。按照“稿件受理通知”中提供的详细地址办理, 务必通过邮局汇款, 切忌夹在纸样材料中随信邮寄! 【为了便于查找, 请在汇款单上注明“稿件编号”。】