



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103454411 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 18

(21) 申请号 201310268486. 2

G01N 33/53 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 06. 28

G01N 33/573 (2006. 01)

(66) 本国优先权数据

201310202841. 6 2013. 05. 27 CN

(71) 申请人 广东省农业科学院动物卫生研究所

地址 510640 广东省广州市天河区五山广东省农业科学院动物卫生研究所

(72) 发明人 马艳平 柯浩 刘振兴 冯国清

郝乐

(74) 专利代理机构 广州知友专利商标代理有限公司

44104

代理人 宣国华

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法及应用

(57) 摘要

一种生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法, 含以下步骤: 采集罗非鱼血清经纯化处理得纯化的罗非鱼 IgM; 将罗非鱼 IgM 免疫兔得兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体, 采用 ELISA 检测兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的抗罗非鱼血清效价; 将纯化的罗非鱼 IgM 加强免疫后, 收集、分离得含有兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的血清, 经纯化处理, 加入生物素混匀, 得生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体; 采用该法制成的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体特异性好, 纯度和效价高, 能与罗非鱼 IgM 发生特异性结合反应; 还公开了上述方法制成的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体在 ELISA 中的应用及在 Western-Blot 中的应用。

1. 一种生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法,其特征是含以下步骤:
 - (1) 选取健康罗非鱼的尾动脉血,静置使血清充分析出,离心,取上清,得罗非鱼血清;
 - (2) 取罗非鱼的血清,用等体积 PBS 稀释后,加入饱和硫酸铵搅拌处理,离心,取沉淀,溶解后,进行纯化处理,得纯化的罗非鱼 IgM;
 - (3) 第一次免疫时,按 200 μ g/ 只 SPF 级新西兰兔的免疫剂量,取步骤 (2) 纯化的罗非鱼 IgM 与等体积的完全弗氏佐剂混合,充分乳化后在 SPF 级新西兰兔背部皮下进行多点注射免疫,10-14 天后进行第二次、第三次以及第四次免疫,第二、三、四次免疫是将纯化的罗非鱼 IgM 按 200 μ g/ 只 SPF 级新西兰兔的免疫剂量与等体积的不完全弗氏佐剂混合,充分乳化,在新西兰兔背部皮下多点注射免疫,每次间隔 10-14 天,第四次免疫后第 10 天,对免疫的新西兰兔耳静脉采血,ELISA 检测新西兰兔血清中抗罗非鱼 IgM 抗体的效价;
 - (4) 四免后,用纯化的罗非鱼 IgM 按 100 μ g/ 只的免疫剂量加强免疫新西兰兔,2 ~ 4 天内进行心脏采血,收集、分离得到含有抗罗非鱼 IgM 的兔多克隆抗体的血清,再经纯化处理,得兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体,将兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体与生物素混匀,获得生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体。
2. 根据权利要求 1 所述的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法,其特征是:步骤 (2) 中饱和硫酸铵的用量为罗非鱼血清的 1.5 ~ 3 倍,其 pH 为 7.4, PBS 的 pH 也为 7.4。
3. 根据权利要求 1 所述的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法,其特征是:步骤 (2) 和步骤 (4) 中纯化处理采用 ProteinA+ProteinG 亲和层析柱过柱纯化处理。
4. 根据权利要求 1 所述的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法,其特征是:步骤 (4) 中四免后血清效价达到 1 :640000 以上,用纯化的罗非鱼 IgM 按 100 μ g/ 只的免疫剂量加强免疫新西兰兔。
5. 根据权利要求 1 所述的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法,其特征是:步骤 (4) 中兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体在与生物素混匀前先经透析处理。
6. 根据权利要求 1 所述的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法,其特征是:步骤 (4) 中所述的兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体与生物素的浓度和用量相同。
7. 根据权利要求 1 所述的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法,其特征是:步骤 (4) 中将兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体与生物素混匀,作用 3 ~ 5 小时后,进行透析处理以及采用 BCA 试剂盒测定其浓度并分装,获得生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体。
8. 一种生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体,其特征是:采用权利要求 1-7 任一项所述的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法制成。
9. 权利要求 8 所述的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体在 ELISA 法检测罗非鱼血清抗体效价中的应用。
10. 权利要求 8 所述的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体在 Western-Blot 中的应用。

一种生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于多克隆抗体技术领域,具体涉及为一种生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 免疫球蛋白是动物体液免疫应答中的重要分子,作为低等脊椎动物的硬骨鱼类的主要免疫球蛋白就是 IgM。该分子是一个四聚体,每个单体包含 2 条重链和 2 条轻链。高度纯化的鱼类血清 IgM 在鱼类免疫学中有重要的用途,如制备单克隆、多克隆抗体,检测鱼类病原体及鱼类免疫应答水平;探索 IgM 的产生、分布,还可用于研究免疫系统的进化。

[0003] 罗非鱼已被农业部列为产业化开发的优质鱼类品种,近年来,随着养殖环境的破坏,养殖密度的增加,导致病害日趋严重,进而导致药物滥用、残留严重,商品鱼出口受阻,严重影响了我国罗非鱼养殖产业的可持续发展,研究开发鱼类疫苗,对罗非鱼的养殖与病害防制有重要意义。高纯度血清免疫球蛋白 IgM 及其抗体的制备是研究鱼类免疫应答、免疫检测方法的基础。目前,市面上还没有兔抗罗非鱼 IgM 抗体商品的出现,这为罗非鱼免疫应答水平的监测、及其免疫检测方法的建立提供了不利因素。因此,有必要制备特异性好、高纯度、高效价的兔抗罗非鱼 IgM 的多克隆抗体,为罗非鱼病害防治研究提供基础材料。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法,采用该制备方法制成的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体特异性好,且纯度和效价高,并能与罗非鱼 IgM 发生特异性结合反应。

[0005] 本发明的目的还在与提供采用上述生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法制成的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体。

[0006] 本发明的第三个目的在于提供采用上述方法制成的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体在 ELISA 法检测罗非鱼血清抗体效价中的应用。

[0007] 本发明的第四个目的在于提供采用上述方法制成的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体在 Western-Blot 中的应用。

[0008] 本发明的第一个目的是通过如下技术方案来实现的:一种生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法,含以下步骤:

[0009] (1) 选取健康罗非鱼的尾动脉血,静置使血清充分析出,离心,取上清,得罗非鱼血清;

[0010] (2) 取罗非鱼的血清,用等体积 PBS 稀释后,加入饱和硫酸铵搅拌处理,离心,取沉淀,溶解后,进行纯化处理,得纯化的罗非鱼 IgM;

[0011] (3) 第一次免疫时,按 200 μ g/只 SPF 级新西兰兔的免疫剂量,取步骤(2)纯化的罗非鱼 IgM 与等体积的完全弗氏佐剂混合,充分乳化后在 SPF 级新西兰兔背部皮下进行多

点注射免疫,10-14 天后进行第二次、第三次以及第四次免疫,第二、三、四次免疫是将纯化的罗非鱼 IgM 按 200 μ g/ 只 SPF 级新西兰兔的免疫剂量与等体积的不完全弗氏佐剂混合,充分乳化,在新西兰兔背部皮下多点注射免疫,每次间隔 10-14 天,第四次免疫后第 10 天,对免疫的新西兰兔耳静脉采血,ELISA 检测新西兰兔血清中抗罗非鱼 IgM 抗体的效价;

[0012] (4) 四免后,用纯化的罗非鱼 IgM 按 100 μ g/ 只的免疫剂量加强免疫新西兰兔,2~4 天内进行心脏采血,收集、分离得到含有抗罗非鱼 IgM 的兔多克隆抗体的血清,再经纯化处理,得兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体,将兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体与生物素混匀,获得生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体。

[0013] 本发明步骤 (2) 中饱和硫酸铵的用量为罗非鱼血清的 1.5~3 倍,其 pH 为 7.4, PBS 的 pH 也为 7.4。

[0014] 本发明步骤 (2) 和步骤 (4) 中纯化处理采用 ProteinA+ProteinG 亲和层析柱过柱纯化处理。

[0015] 本发明步骤 (4) 中四免后血清效价达到 1:640000 以上,用纯化的罗非鱼 IgM 按 100 μ g/ 只的免疫剂量加强免疫新西兰兔。

[0016] 本发明步骤 (4) 中兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体在与生物素混匀前先经透析处理。

[0017] 本发明步骤 (4) 中所述的兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体与生物素的浓度和用量相同。

[0018] 本发明步骤 (4) 中将兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体与生物素混匀,作用 3~5 小时后,进行透析处理以及采用 BCA 试剂盒测定其浓度并分装,获得生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体。

[0019] 本发明步骤 (1) 中优选在 37 $^{\circ}$ C 静置 2 小时,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜使血清充分析出,4000rpm/min 离心 10min,取上清,得罗非鱼血清。

[0020] 本发明步骤 (2) 中离心时的转速优选为 7000rpm,离心时间优选为 30min。

[0021] 本发明的第二个目的是通过如下技术方案来实现的:一种生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体,其特征是:采用上述的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法制成。

[0022] 本发明的第三个目的是通过如下技术方案来实现的:上述生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方制成的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体在 ELISA 法检测罗非鱼血清抗体效价中的应用。

[0023] 本发明的第四个目的是通过如下技术方案来实现的:上述生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方制成的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体在 Western-Blot 中的应用。

[0024] 本发明具有如下有益效果:

[0025] 本发明制备的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体具有特异性好、纯度高、效价高的特点,可与罗非鱼 IgM 发生特异性结合反应、可用于 ELISA 实验的要求。本发明生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备与应用,为罗非鱼有害细菌、病毒的疫苗研制、免疫水平检测以及免疫检测方法的建立提供一个重要工具,具有重要的理论意义和生产价值。

附图说明

[0026] 图 1 为本发明实施例 1 中罗非鱼 IgM 纯化的 SDS-PAGE 图谱；

[0027] 图 2 为实施例 3 中荧光扫描仪扫描显色图,为 Western-blot 显色图谱,在 80KD 处重链有一明显的杂交条带。

具体实施方式

[0028] 结合附图和实施例对本发明作进一步说明：

[0029] 实施例 1

[0030] 本实施例提供的兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的制备方法,步骤如下所示：

[0031] (1) 健康的罗非鱼 5 尾,体重 400-450g,从尾动脉采血,37℃放置 2h,4℃静置过夜使血清充分析出,4℃ 4000rpm/min,离心 30min,取上清；

[0032] (2) 将罗非鱼血清用等体积 0.01mol/L PBS(pH7.4) 稀释后,加入两倍 pH7.4 的饱和硫酸铵,边加溶液边搅拌;加完后继续搅拌 1 小时,进行离心,7000rpm,30min,取沉淀；

[0033] (3) 将沉淀用 PBS 溶解后,ProteinG+ProteinA 亲和层析柱过柱纯化 IgM,BCA 试剂盒测定浓度,如图 1 所示,为纯化后 IgM SDS-PAGE 图谱；

[0034] (4) 将 200 μg 纯化罗非鱼 IgM 与等体积的完全弗氏佐剂混合,充分乳化后在兔背部皮下多点注射免疫,10-14 天内,用 200 μg 纯化罗非鱼 IgM 与等体积的不完全弗氏佐剂混合进行第二次、第三次、第四次免疫,乳化充分后,在兔背部皮下多点注射免疫,先后共注射免疫四次,每次免疫间隔 10-14 天,第四次免疫 10 后,兔耳静脉采血,ELISA 检测血清中兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体的效价；

[0035] (5) 用 100 μg 纯化的罗非鱼 IgM 加强免疫第四次免疫后的新西兰兔,2-4 天后,收集、分离得到的含有抗罗非鱼 IgM 的兔多克隆抗体的血清,ELISA 检测兔血清抗罗非鱼 IgM 的效价；

[0036] 所测兔血清抗罗非鱼 IgM 的效价为 1:640000 以上；

[0037] (6) 用蛋白纯化仪,ProteinG+ProteinA 亲和层析柱过柱纯化兔抗罗非鱼 IgM 的多克隆抗体；

[0038] (7) 用 BCA 试剂盒测定收集样品的浓度进行分装,所测纯化多抗浓度为 1.539mg/mL;ELISA 测定纯化后兔多抗的滴度；

[0039] 所测纯化兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体滴度为 3.125 μg/mL,即效价为 1:320000。

[0040] (8) 纯化的兔抗 IgM 多克隆抗体,过夜透析,与等量的生物素溶液混合,作用 4 个小时以上,标记好的生物素-兔抗 IgM 多克隆抗体过夜透析,得生物素-兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体用于 ELISA 检测得到良好的线性数据,证实生物素、兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体标记成功,ELISA 测定抗体滴度和最佳工作稀释度。测定抗体滴度为 5.69 μg/mL,抗体效价为 1:160000,最佳工作稀释度为 1:10000。

[0041] 实施例 2

[0042] 本实施例提供的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体应用步骤如下：

[0043] (1) 试验罗非鱼经 1.93×10^3 cfu/尾低剂量无乳链球菌腹腔注射,采集 48h,72h,一周、12 天尾动脉血,37℃静置 2 小时,4℃冰箱过夜使血清充分析出,4000rpm/min 离心 10min,取上清,得罗非鱼血清；

[0044] (2) 取无乳链球菌菌液, 12000rpm/min 离心 5min, 超声波破碎, BCA 试剂盒测定裂解菌液浓度, 按 80 μ g/ml 浓度 100 μ l/孔包被 100 μ L/孔包被 ELISA 板, 4 $^{\circ}$ C 过夜;

[0045] (3) 甩掉包被液, 1% 牛血清白蛋白封闭 ELISA 板, 37 $^{\circ}$ C 作用 2 个小时;

[0046] (4) PBST 洗板三次, PBS 溶液梯度稀释 (1) 步所得血清, 100 μ L/孔加入 ELISA 板中, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 个小时;

[0047] (5) PBST 洗板三次, PBS 溶液 1:10000 稀释生物素-兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体, 100 μ L/孔加入 ELISA 板中, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 个小时;

[0048] (6) PBST 洗板三次, PBS 溶液 1:10000 稀释 HRP-链亲和霉素, 100 μ L/孔加入 ELISA 板中, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 个小时;

[0049] (7) PBST 洗板三次, 每孔加入 100 μ LTMB 工作液, 37 $^{\circ}$ C 作用 20 分钟;

[0050] (8) 每孔加入 50 μ L 终止液终止反应, 酶标仪读数, 确定罗非鱼血清效价。结果显示 48h 罗非鱼血清效价最高, 达 1:51200, 随后血清效价降低, 12 天血清效价为 1:6400。证实所制备的生物素标记兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体可以用于检测罗非鱼血清抗体效价的监测。

[0051] 实施例 3

[0052] 本实施例提供的兔抗罗非鱼 IgM 多克隆抗体应用于 Western-blot, 步骤如下:

[0053] (1) 将 5 μ g 罗非鱼 IgM 用 12% 分离胶进行常规 SDS-PAGE 电泳;

[0054] (2) 电泳结束后, 电转至硝酸纤维素膜 (NC) 上;

[0055] (3) 转膜结束后, 剪下 Marker 条带在氨基黑染液中染 5min, 再用脱色液脱色, 直到蛋白带清晰为止;

[0056] (4) NC 膜加入 5% 脱脂奶粉中, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h, TBST 洗 3 次, 每次 10min;

[0057] (5) 加入纯化后的多抗 (稀释至 3.125 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min, TBST 洗 3 次, 每次 10min;

[0058] (6) 加入荧光标记 Donkey anti-Rabbit IgG1:15000, 37 $^{\circ}$ C 温育 60min, TBST 洗 3 次, 每次 10min;

[0059] (7) 荧光扫描仪扫描显色, 如图 2 所示, 为 Western-blot 显色图谱, 在 80KD 处重链有一明显的杂交条带。

[0060] 以上实施例仅用于阐述本发明, 而本发明的保护范围并非仅仅局限于以上实施例。所述技术领域的普通技术人员依据以上本发明公开的内容和各参数所取范围, 均可实现本发明的目的。

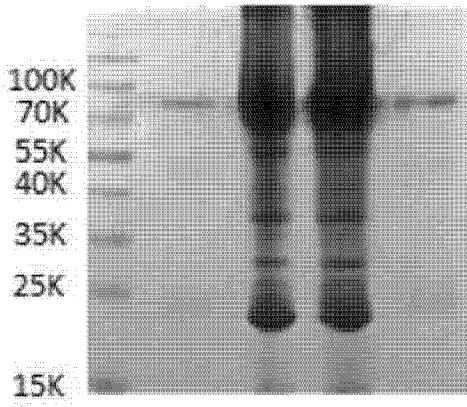


图 1

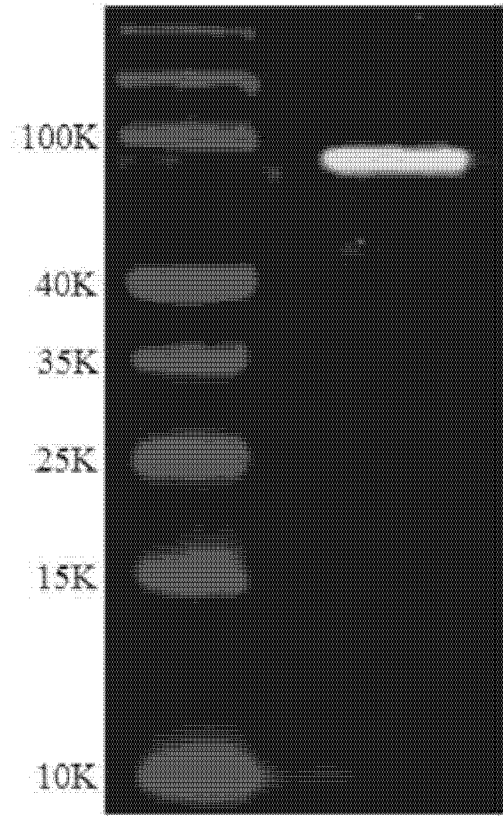


图 2

专利名称(译)	一种生物素标记兔抗罗非鱼IgM多克隆抗体的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN103454411A	公开(公告)日	2013-12-18
申请号	CN201310268486.2	申请日	2013-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	广东省农业科学院动物卫生研究所		
申请(专利权)人(译)	广东省农业科学院动物卫生研究所		
当前申请(专利权)人(译)	广东省农业科学院动物卫生研究所		
[标]发明人	马艳平 柯浩 刘振兴 冯国清 郝乐		
发明人	马艳平 柯浩 刘振兴 冯国清 郝乐		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/573		
优先权	201310202841.6 2013-05-27 CN		
其他公开文献	CN103454411B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种生物素标记兔抗罗非鱼IgM多克隆抗体的制备方法，含以下步骤：采集罗非鱼血清经纯化处理得纯化的罗非鱼IgM；将罗非鱼IgM免疫兔得兔抗罗非鱼IgM多克隆抗体，采用ELISA检测兔抗罗非鱼IgM多克隆抗体的抗罗非鱼血清效价；将纯化的罗非鱼IgM加强免疫后，收集、分离得含有兔抗罗非鱼IgM多克隆抗体的血清，经纯化处理，加入生物素混匀，得生物素标记兔抗罗非鱼IgM多克隆抗体；采用该法制成的生物素标记兔抗罗非鱼IgM多克隆抗体特异性好，纯度和效价高，能与罗非鱼IgM发生特异性结合反应；还公开了上述方法制成的生物素标记兔抗罗非鱼IgM多克隆抗体在ELISA中的应用及在Western-Blot中的应用。

