

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710070419.4

[51] Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 6 月 25 日

[11] 公开号 CN 101205254A

[22] 申请日 2007.8.3
[21] 申请号 200710070419.4
[71] 申请人 浙江大学
地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38
号浙大动科院
[72] 发明人 吴信忠 姜玉声 吴刘记

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司
代理人 陈祯祥

权利要求书 1 页 说明书 10 页

[54] 发明名称

九孔鲍 NF- κ B 抗体的制备及其检测方法

[57] 摘要

九孔鲍 NF- κ B (Ab-Rel) 抗体的制备及其检测方法。按 Ab-Rel 全长 cDNA 序列, 设计用于扩增 RHD 和 TD 片段的寡聚核苷酸引物, 获得编码框表达载体 pGEX-RHD 和 pGEX-TD; 转化大肠杆菌重组蛋白的表达与鉴定, 经凝胶亲和柱纯化后, 注射家兔得到 Ab-Rel 的 RHD 和 TD 两个多克隆抗体, 用间接夹心 ELISA 检测抗体的效价; 用两种抗体对 Ab-Rel 的 RHD 和 TD 进行蛋白印迹 (Western blotting) 检测; 亦可利用双抗体与二抗联用间接夹心酶联免疫反应试验 (ELISA) 检测 Ab-Rel 的 RHD 和 TD。本发明提供一种对养殖贝类, 特别是九孔鲍免疫因子的检测技术。

1、九孔鲍 NF- κ B 抗体的制备方法，其特征是包括以下操作步骤：

(1)按克隆出的由 SEQNO1 和 SEQNO2 记载的九孔鲍 NF- κ B 基因全长序列设计的用于扩增 RHD 和 TD 片段的寡聚核苷酸引物：RHD:pRf:AGGATCCGAACCAGCACCTCAGCAA 和 pRr:ACTCGAGCGGCATGTAAGTGAACGGAAT ; TO : TDf:AGGATCCGCAGCCCACTTTGTTCAG 和 TDr2:ACTCGAG CCATGTCGATGGTGTCTG;

(2) 构建表达载体 pGEX-RHD 和 pGEX-TD，转化大肠杆菌 BL21；

(3) 表达载体经谷胱甘肽 GST 凝胶亲和柱纯化后，分别注射家兔得到相应的抗九孔鲍 NF- κ B 的 RHD 和 TD 的两个多克隆抗体。

2、由权利要求 1 制备的 RHD 和 TD 两个多克隆抗体检测九孔鲍免疫因子的方法，其特征是用 RHD 和 TD 两个多克隆抗体分别对九孔鲍核转录因子 RHD 和 TD 两个蛋白活性结构区进行 **Western** 蛋白印迹检测。

3、由权利要求 1 制备的 RHD 和 TD 两个多克隆抗体检测九孔鲍免疫因子的方法，其特征是利用双抗体与二抗联用间接夹心酶联免疫反应试验 ELISA 检测九孔鲍核转录因子 RHD 和 TD 蛋白活性结构区。

九孔鲍 NF- κ B 抗体的制备及其检测方法

技术领域

本发明属于无脊椎动物中贝类的免疫因子抗体的制备及其检测方法。

背景技术

核转录因子- κ B (Nuclear factor-kappa B, NF- κ B)是重要的免疫因子,它是具有几个成员的家族。20 世纪后期, Sen 和 Baltimore 从 B 淋巴细胞核抽提物中首次发现该因子,起初它被认为是一种能与免疫球蛋白 κ 链基因增强子特异结合,并能促进 κ 链基因表达的球蛋白((Sen R and Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. Cell 1986; 46: 705-716.)). 此后的 20 多年中, NF- κ B 及其介导的信号通路得到了广泛而深入地研究。大量研究发现 NF- κ B 能与细胞因子、粘附因子等基因启动子或增强子部位的 κ B 位点发生特异性结合,进而参与调控这些基因的转录,在机体的免疫应答、炎症反应、细胞凋亡和生长发育方面发挥着重要的作用 (Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu. Rev. Immunol. 1998; 16: 225-260)。贝类在无脊椎动物中占有重要地位,贝类养殖已跃居整个水产养殖业的第一位,九孔鲍是我国南方海水养殖的重要经济贝类。随着大规模养殖的兴起,病害成为阻碍贝类养殖的主要因素之一,但目前还没有针对贝病的有效控制途径。如何利用现代免疫生物技术防治贝类病害将成为保障鲍安全养殖、稳定发展的关键因素,而对其宿主分子免疫机理的研究是研究新型免疫生物抗病技术的基础。利用核转录因子- κ B 的生物学特性,结合现代分子生物学技术研究九孔鲍分子免疫机理将有利于从病原与宿主两方面入手,开创有效的防治贝病的新思路和新技术。本申请人曾申请过申请号为 200510061771.2,名称为《九孔鲍免疫因子特异抗体的制备及其检测方法》。该申请没有充分公开九孔鲍 NF- κ B 基因的全长序列以及九孔鲍 NF- κ B 两个结构域的引物具体序列等内容,因而难以实现制备九孔鲍免疫因子抗体的目的。

发明内容

本发明针对上述专利申请文件的缺陷,充分公开相关内容,以达到制备九孔鲍免疫因子特异抗体及其检测方法的目的。

众所周知, NF- κ B 家族的蛋白的 N 端通常具有一个同源区 (RHD),通常大小在 300 个氨基酸左右,该区域是与 DNA 结合形成聚合物的功能区;而位于 C 端的转录激活域

(transactivation domain, TD)具有转录激活功能,该区域在 NF- κ B 家族各成员之间的保守性较低。本专利申请发明人首次克隆九孔鲍 NF- κ B 转录因子 (*Ab-Rel*) 的 cDNA 的核苷酸全序列与预测编码的氨基酸序列,如 SEQNO1、NO2 所示,并且首先发现, *Ab-Rel* 也具有 RHD 和 TD 两个功能结构区。其中, RHD 是位于在 N 末端第 91—377 个氨基酸残基之间, TD 是位于在 C 末端第 383—584 个氨基酸残基之间(详见 SEQNO1)。

本发明的主要内容是按申请人克隆出的九孔鲍 NF- κ B 基因全序列,设计了扩增九孔鲍 NF- κ B 转录因子 (*Ab-Rel*) N 末端 RHD(在 78-368 个氨基酸残基间)和 C 末端 TD(在 383-520 个氨基酸残基间)片段的寡聚核苷酸引物,获得了 RHD 和 TD 两个重组表达的蛋白,将纯化重组蛋白作为抗原,制备了 RHD 和 TD 两个多克隆抗体,并建立了间接夹心酶联免疫反应试验(ELISA)和蛋白杂交(Western blotting)的方法,来检测该 NF- κ B 因子的 RHD 和 TD 在不同时段和不同环境作用下蛋白水平的变化,进而提供一种对养殖贝类,特别是九孔鲍 NF- κ B 因子的检测技术。

基于 NF- κ B 的保守结构,本申请发明人从九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)血淋巴细胞中克隆了 NF- κ B 基因的全长序列,依据获得的该基因序列,设计了扩增 *Ab-Rel* N 末端 RHD(SEQNO1 中第 78-368 个氨基酸残基间)和 C 末端 TD(SEQNO1 中 383-520 个氨基酸残基间)片段的寡聚核苷酸引物,利用原核表达系统分别表达九孔鲍 NF- κ B 的 RHD 和 TD 两个活性结构区,产物经凝胶亲和柱纯化后,分别注射家兔得到相应的抗九孔鲍 NF- κ B 的 RHD 和 TD 两个多克隆抗体,并建立了间接夹心酶联免疫反应试验(ELISA)和蛋白印迹(Western blotting)的方法,能有效地检测出该蛋白因子在不同时段和不同环境作用下蛋白水平的变化。其中,抗 RHD 抗体对所有 NF- κ B 家族的蛋白都有效;抗 TD 抗体只对九孔鲍 NF- κ B 蛋白有效。利用两种抗体分别对九孔鲍 NF- κ B 因子进行 Western blotting 检测,比对相应的阳性条带,最终结果将更准确、可靠。而在 ELISA 检测中加入双抗体,将使得抗体与抗原间有更多的结合位点,加入二抗时,原有的信号将会成倍放大,这种利用双抗体与二抗联用的间接夹心 ELISA 检测方法比用单一抗体检测更灵敏,且操作简单,省时、省力,尤其适用于如 NF- κ B 这样表达量极少的免疫因子的检测。

本技术方案的操作步骤如下:

一、九孔鲍 NF- κ B (*Ab-Rel*) 抗体的制备

1. 引物设计与合成

参照已获得的 *Ab-Rel* 全长 cDNA 序列(SEQNO1) 设计用于 PCR 扩增 *Ab-Rel* N 末端 RHD(在

78-368 个氨基酸残基间) 和 C 末端 TD (在 383-520 个氨基酸残基间) 片段的寡聚核苷酸引物为:

RHD , pRf:AGGATCCGAACCAGCACCTCAGCAAG 和 pRr:ACTCGAG
CGGCATGTAAGTGAACGGAAT;

TD , TDr:AGGATCCGCAGCCCACTTTGTTCAG 和 TDr2:ACTCGAG
CCATGTCGATGGTGTTCG

2. PCR 扩增与表达载体的构建

以上述九孔鲍 cDNA 为模板扩增目的片段, PCR 扩增 RHD 的反应条件为: 95℃ 3 min; 35 个循环: 94℃ 1 min, 62℃ 1 min, 72℃ 1 min; 72℃ 5 min。PCR 扩增 TD 的反应条件为: 95℃ 3 min; 35 个循环: 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min; 72℃ 5 min。PCR 产物分别连入 pGEM-T easy 载体, 转化大肠杆菌 TG I, 涂布 LBA 筛选平板, 挑若干个克隆进行酶切和 PCR 鉴定, 选一阳性克隆扩大培养, 以碱法抽提质粒。将制备好的质粒以 *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性内切酶双酶切, 连入经过同样双酶切的 pGEX-4T-2 载体的相应位点上, 转化大肠杆菌 TG I。PCR 筛选阳性克隆, 经测序鉴定获得编码框正确的表达载体 pGEX-RHD 和 pGEX-TD。

3. 重组蛋白的表达与鉴定

将阳性重组质粒 pGEX-RHD 和 pGEX-TD 分别转化表达宿主菌 BL21 感受态, 涂布 LBA 平板, 37℃ 培养过夜。挑取一个单克隆菌落, 转入 LBA 培养液, 37℃ 振荡培养过夜。取适量菌液, 按 1:100 扩大培养至 OD₆₀₀ 为 0.4-0.5 时, 将菌液分为若干等份, 不加或分别加入 IPTG, 使其终浓度在 0-1.0 mmol/L, 继续培养 6 h, 离心收集细菌。细菌经超声波裂解后, 离心分离上清液和沉淀, 分别上样, 进行 SDS-PAGE 电泳。

4. 纯化重组蛋白作为抗原用于抗体制备

利用谷胱甘肽(GST)亲和层析柱对表达产物进行分离纯化。以上述方法大量制备超声裂解的菌液, 离心分离上清液。按产品说明书进行蛋白的纯化和洗脱操作, 12% 的 SDS-PAGE 电泳鉴定。

挑选体重约 1.5 kg 的健康日本大耳白雄兔, 用重组蛋白作为抗原进行免疫, 经过一次初始免疫和两次加强免疫后, 在兔颈动脉取血, 分离血清, 即获得了抗九孔鲍 NF- κ B 的 RHD 和 TD 两个多克隆抗体, 存储于 -80℃ 备用。

5. 蛋白质定量与抗体效价的检测

按Bradford法对蛋白进行定量(**Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976, 72: 248-254)。

免疫后的兔血清用 ELISA 方法检测效价，具体操作如下：

- (1) 包被与封闭：用包被缓冲液将蛋白稀释至 1-10 $\mu\text{g/ml}$ 。在每个聚苯乙烯酶标板的反应孔中加 0.1 ml，4℃过夜。弃去孔内溶液，5%的脱脂奶粉封闭 2 h，用 PBST 洗 3 次，每次 3 min
- (2) 加样：加指定稀释倍数的待检样品（待检测的抗血清稀释于 PBST）0.1 ml 于上述已包被的反应孔中，置 37℃孵育 1 h，PBST 洗 3 次，每次 3 min（同时做空白孔，阴性对照孔及阳性对照孔）
- (3) 加酶标抗体：于各反应孔中，加入新鲜稀释的酶标抗体 0.1ml，37℃ 1 h，PBST 洗 3 次，每次 3 min。
- (4) 加底物液显色：于各反应孔中加入新鲜配制的 OPD 底物溶液 0.1 ml，37℃显色 10-30 分钟。
- (5) 终止反应：于各反应孔中加入 2 M 反应终止液 0.05 ml。
- (6) 结果分析：用酶标仪 490 nm 测各孔 OD 值，大于规定的阴性对照 OD 值的 2.1 倍，即为阳性。计算抗体效价公式：(样本 OD 值-空白对照 OD 值)/(阴性对照 OD 值-空白对照 OD 值)。

二、九孔鲍免疫因子 NF- κ B (Ab-Re1) 的检测

1. Western 蛋白印迹 (Western blotting) 检测

Western 蛋白印迹操作按文献(**Sambrook J, Russell DW** 著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南, 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002. (Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)), 具体如下：

- (1) 蛋白质样品（纯化的重组蛋白和血淋巴细胞总蛋白）进行 SDS-PAGE 电泳
- (2) 转膜（半干式）：电泳结束后将胶条割至合适大小，浸入转膜缓冲液平衡 15 min。预先裁好与胶条同样大小的滤纸和 PVDF 膜，浸入转膜缓冲液中 10 min。转膜装置的搭建：按从下至上顺序依次为阳极碳板、3 层滤纸、PVDF 膜、凝胶、3 层滤纸、阴极碳板，滤纸、凝胶、膜精确对齐，每一步去除气泡，将碳板上多余的液体吸干。恒流 0.8 mA/cm²，转移 1 h。

(3) 免疫杂交反应:

- a 用 PBST 洗膜, 5 min ×3 次。
- b 加入封闭液, 平稳摇动, 室温 2 h。
- c 弃封闭液, 用 PBST 洗膜, 5 min×3 次。
- d 将膜转入一抗杂交液 (抗血清按预定比例稀释于封闭液), 室温杂交 2 h。阴性对照中以免疫前的血清取代一抗, 其余步骤与实验组相同。
- e 弃杂交液, 用 PBST 洗膜, 5 min×4 次。
- f 将膜转入二抗杂交液 (辣根过氧化物酶偶联的二抗按合适稀释比例稀释于 PBST), 平稳摇动, 室温 2 h。
- g 弃杂交液, 用 PBST 洗膜, 5 min×4 次。
- h 加入显色液, 避光显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应。

2. 间接夹心 ELISA (即双抗体间接 ELISA) 检测九孔鲍免疫因子 NF- κ B (Ab-Rel)**1. 主要试剂及配制**

OPD 为上海生工公司进口分装, 辣根过氧化物酶标记的第二抗体和 96 孔酶标板购自鼎国生物技术公司。其它化学试剂除特别注明外, 均为国产分析纯。

主要试剂的配制如下:

- (1) PBST: PBS+0.1% Tween 20 (NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g, 0.1% Tween 20, 加蒸馏水至 1000 ml, pH 7.4)
- (2) 封闭液 (5%脱脂奶粉): 脱脂奶粉溶于 PBST 中 (5%)
- (3) 包被缓冲液 (0.05 M 碳酸盐缓冲液, PH9.6): Na₂CO₃ 1.59 g, NaHCO₃ 2.93 g, 加蒸馏水至 1000 ml
- (4) 阴性对照: 牛血清白蛋白(BSA) 0.1 g 加包被缓冲液至 100 ml
- (5) 显色底物缓冲液(PH5.0):

0.2 M Na ₂ HPO ₄ (28.4 g/l)	25.7 ml
0.1 M 柠檬酸 (19.2 g/l)	24.3 ml
H ₂ O	50 ml
30% H ₂ O ₂	15 μ l
OPD	40 mg
- (6) 终止液: 2 M H₂SO₄, 蒸馏水 178.3 ml, 逐滴加入浓硫酸(98%) 21.7 ml

2. 双抗体间接 ELISA 检测法

(1) 以 Brad-ford 法对蛋白进行定量(**Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976, 72: 248-254**)。

(2) 间接 ELISA 检测

① 用包被缓冲液将待测样品稀释至 800 $\mu\text{g/ml}$ 。

② 于酶标板各孔加 100 μl 稀释的可溶性抗原, 4 $^{\circ}\text{C}$ 18 小时后取出, 弃去包被液, 用 PBST 洗涤 3 次, 加入封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 2 小时后, 甩干封闭液, 用 PBST 洗涤 3 次, 5 min/次, 甩干。

③ 按预定的抗体稀释比例, 用封闭液稀释抗 RHD 和 TD 抗体, 每孔加入 100 μl 稀释液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 小时, PBST 洗涤 3 次, 5 min/次, 甩干。

④ 按照说明用 PBST 稀释酶标二抗, 每孔加入 100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 小时后用 PBST 洗涤 3 次, 5 min/次, 甩干。

⑤ 加入显色液, 每孔 100 μl , 室温作用 5 分钟后, 加 2 M 硫酸终止反应。

⑥ 结果分析: 用酶标仪 492 nm 测各孔 OD 值, 大于规定的阴性对照 OD 值的 2.1 倍, 即为阳性。计算抗体效价公式: (样本 OD 值-空白对照 OD 值)/(阴性对照 OD 值-空白对照 OD 值)。

本发明的有益效果

本发明技术操作简单、省时、省力, 可快速、可靠的检测出九孔鲍 NF- κ B (*Ab-Rel*) 这一表达量很少的免疫因子。

目前对贝类免疫系统的研究还处于起始阶段, 可借鉴的数据和资料非常有限, 而对于贝类免疫因子的检测, 还没有一套完整、成熟的系统。基于对高等动物和许多模式物种的研究结果以及对现有分子生物技术的整合, 该项发明建立了鲍鱼免疫因子 *Ab-Rel* 检测系统, 能为日后创建更有效, 成熟的贝类免疫因子的检测方法及贝类免疫系统模型的构建提供参考。

具体实施方式

本发明的实施例:

1、九孔鲍 NF- κ B 的 RHD 和 TD 重组蛋白的表达与鉴定:

将阳性重组质粒 pGEX-RHD 和 pGEX-TD 分别转化表达宿主菌 BL21 感受态, 涂布 LBA 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑取一个单克隆菌落, 转入 LBA 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜。取适

量菌液，按 1:100 扩大培养至 OD_{600} 为 0.4-0.5 时，将菌液分为若干等份，不加或分别加入 IPTG，使其终浓度在 0-1.0 mmol/L，继续培养 6 h，离心收集细菌。细菌经超声波裂解后，离心分离上清液和沉淀，分别上样，进行 SDS-PAGE 电泳。

2、抗 RHD 和 TD 抗体的制备：

(1) 蛋白纯化

①表达 GST-RHD 和 GST-TD 的菌液各 100ml， $10000\times g$ ，离心 10 分钟；分别加入 4ml PBS，超声破碎 50 次，每次 3 秒；加入 PMSF 之终浓度 10mmol 混匀， $10000\times g$ ，离心 10 分钟；上清液经 0.22 μ 的滤器过滤，至于冰上待用。

②用 10 倍柱体积的 PBS 平衡 Glutathione Sepharose 凝胶亲和纯化柱，将超声破碎的滤液，用注射器以 1ml/min 的速度缓慢通过纯化柱。

③10 倍柱体积的 PBS 洗柱，以 10 倍柱体积的洗脱液洗脱结合的蛋白。

(2) 免疫动物

将纯化的蛋白浓度调制 $2\mu g/\mu l$ ，与等量的弗氏完全佐剂混合，乳化，注射免疫家兔。于两周后再以弗氏完全佐剂乳化纯化的蛋白，进行加强免疫。再两周后，耳静脉取 2 毫升血，检测抗体效价。

(3) 抗体效价检测

用间接夹心 ELISA 技术测定抗体效价及最佳工作浓度。

间接夹心 ELISA 操作： 包被液稀释抗原→抗原包被→洗板→加入不同稀释倍数的一抗→洗板→加入酶标二抗→洗板→加入底物显色液→终止反应→酶标仪检测。

3、九孔鲍 NF- κ B 的检测：

(1) 样品准备：

分别取近九孔鲍的足肌、鳃、外套膜和肝胰腺研磨后加入 2 倍体积的 pH 为 7.4 的 PBS，离心取上清液，经 0.22 μ 的滤器过滤，待用。

(2) Western 蛋白印迹检测：

将待测样品与 $6\times$ 上样缓冲液混合，煮沸 5 分钟，立即至于冰上。样品加入 SDS-PAGE 胶中，电泳后，以半干转移法，转至 PVDF 膜上，转好后的膜放入含 5%脱脂奶粉的 PBST 中封闭 1 小时，弃封闭液，于新的封闭液中按预先计算的一抗效价加入抗 RHD 抗体，轻轻摇动 1 小时，用 PBST 洗 3 次，每次 5 分钟；于 PBST 中加入 HRP 标记的羊抗兔二抗，摇动标记 1

小时；PBST 洗 3 次，每次 5 分钟；于 DAB 显色液中显色，待理想的结果出现后，清水中洗净膜，烘干。

用抗 TD 抗体的 Western blotting 的操作步骤同上。将两次结果相比较，同一位置出现的信号为阳性结果。

(3) 间接夹心 ELISA 检测

① 以 Brad-ford 法对蛋白进行定量(Bradford, 1976)。

② 间接 ELISA 检测

a. 用包被缓冲液将待测样品稀释至 800 $\mu\text{g/ml}$ 。

b. 于酶标板各孔加 100 μl 稀释的可溶性抗原，4 $^{\circ}\text{C}$ 18 小时后取出，弃去包被液，用 PBST 洗涤 3 次，加入封闭液，37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 2 小时后，甩干封闭液，用 PBST 洗涤 3 次，5 min/次，甩干。

c. 按预定的抗体稀释比例，用封闭液稀释抗 RHD 和 TD 抗体，每孔加入 100 μl 稀释液，37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 小时，PBST 洗涤 3 次，5 min/次，甩干。

d. 按照说明用 PBST 稀释酶标二抗，每孔加入 100 μl ，37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 小时后用 PBST 洗涤 3 次，5 min/次，甩干。

e. 加入显色液，每孔 100 μl ，室温作用 5 分钟后，加 2 M 硫酸终止反应。

f. 结果分析：用酶标仪 492 nm 测各孔 OD 值，大于规定的阴性对照 OD 值的 2.1 倍，即为阳性。计算抗体效价公式：(样本 OD 值-空白对照 OD 值)/(阴性对照 OD 值-空白对照 OD 值)。

待测样品	0.424	0.248	0.202	0.169	0.161
	0.362	0.212	0.183	0.183	0.161
BSA 对照	0.064	0.058	0.059	0.028	0.022
	0.073	0.051	0.055	0.062	0.068

九孔鲍 NF- κ B 转录因子 (*Ab-Rel*) 全长 cDNA 序列：

SEQNO1 表示为编码 *Ab-Rel* 的核苷酸序列与预测编码的氨基酸序列（从第 1-584 个氨基酸残基）；

SEQNO2 为 *Ab-Rel* cDNA 的全部核苷酸序列。

序列表

SEQNO1

GATCAGGAAGGTTGTGAGCATATTTAGGGTACTAGTACACCACGAGTAGTGGTCTACCACTAACTTGTCAACA**ATG**ACGACTCTCAG
 M T T L S 5
 CTCAGATTTCTGCCTGGATGATCTGTCTGCTGTGCAGCTACCAAGTGGCGAGCTTGAGAGATATATTCAAACAACTTTGGATTACC
 S D F C L D D L S A V Q L P S G E L E R Y I Q T N F G L P 34
 TGAAGAACAACCAAGTCCAGGCCACTCAAGAAATGAATGGTCAGGGTCCATCACAAGTCCAGACTGGAGTGCAGGGGGGCATGGTCCG
 E E Q P V Q A T Q E M N G Q G P S Q V Q T G V Q G G M V R 63
 TCAGGTACAGTACCGATGTTCTCTAGTGTCTGTCTCACGTACAGAACAGCACCTCAGCAAGCACCTGCTCGCTCAAGCAACCAGCC
 Q V Q S P M F S S A A L T S E P A P Q Q A P A R S S N Q P 92
 ATACATGGAAATAGTCGAGCAACCCAGTCACGGGGACTGCGGTTCCGCTACGAGTGTGAGGGACGATCTGCTGGCAGCATACCGGG
 Y M E I V E Q P Q S R G L R F R Y E C E G R S A G S I P G 121
 GGAACACAGCTCATCTGAAAGAAAGACTTTCCCCACGATAAAGATACGTAATTATAAGGGCCCAGCTATAGTAGTAGTTTCGTGCGT
 E H S S S E R K T F P T I K I R N Y K G P A I V V V S C V 150
 GACCAAAGATCCTCACCCACACTGTAAGCCACATCCACATTCTCTTGTGGGAAAGACTGTAAGAAAGGCGTATGCACAGTAAAGGT
 T K D P H P H C K P H P H S L V G K D C K K G V C T V K V 179
 CAAGGACACAGATACGATAACATTTCTCATCTGGGCATTAGTGTGCCAAGAAGAAGGATGTGGAACACAGTTTAAAGCTGAGAAA
 K D T D T I T F P H L G I Q C A K K K D V E N S L K L R K 208
 AGATATTAATGTGGACCCTTTTCAGACTGGTTTCAATCATGGCATAGGTCAAATTGACCTGAACATGGTCCGCTCTGTGTTTCCAAGT
 D I N V D P F Q T G F N H G I G Q I D L N M V R L C F Q V 237
 CTTCTGCCTGATGCAAGTGGCAAGATCACCAGAGTTGTCCCCCTGTGGTGTCAAACTCATCCATGATAAAAAGTCTGTCAACGA
 F L P D A S G K I T R V V P P V V S Q L I H D K K S V N E 266
 GCTGACAATATGCCGTGTGATCGCAGTTCGGGGAAGGCAAAAGGTGGAGATGAGATCTTCTCTGTGTGAAAAAATTAACAAAGA
 L T I C R V D R S S G K A K G G D E I F L L C E K I N K D 295
 TGATATCCAGGTCCGATTCTTTAAAGACACAGCTGCTGGTTGCATGTGGGAAGACTTTGGTGATTTTGGACAGGGGGACCTGCATAG
 D I Q V R F F K D T A A G C M W E D F G D F G Q G D V H R 324
 ACAGTTTGTGTCGTGTTCAAGACCCACCTTACAAAGAAGCATTCATACAGCAACCAGTAGACGTGCAGATGCAGCTGAGACGACC
 Q F A V V F K T P P Y K E A F I Q Q P V D V Q M Q L **R R P** 353
 GTCTGACAATGAAACCTCGGAATCGATTCCGTTCACTTACATGCCGGAGGATCCTGATCCAGATAGAATTGAGGAGAAAAGGAAGCG
S D N E T S E S I P F T Y M P E D P D P D R I E E K R K R 382
 CAAAGCAGCCCACCTTTGTTTCAGAACTGGGGTGGTTTCAGTGAGTGAAGAGAGGGAATGCCACAGTCAAAGAAGGGTTGCGGACGAAGCT
 K A A H F V Q N W G G S V S E R G N A T V K E G L R T K L 411
 GAGAGCCAATCGCAGGATCAAACAGGAAGGAGAGCCGATGGTGCAAGATGAACTGCCAGATATTCTTTACCAACACCGGCGCCAG
 R A N R R I K Q E G E P M V Q D E L P R Y S F T N T G A S 440
 TGCTACAGCAGGCAGCATGACAGGTATGCCACGATGAACATCCGCACAGCGGACAACACTGCCATGGGGAGCATGACCGTCTCCAA
 A T A G S M T G M P T M N I R T A D N T A M G S M T V S N 469
 CACAACGTCCACGGCACCCAACCCCAAGTTTCAGAACTTGAGGATCGACCACACAGGGAATGTAATTGACAGCTCGGCTGTTTCAGAA
 T T S T A P N P Q F Q N L R I D H T G N V I D S S A V Q N 498
 CCAACAGCAGCAGAACATCCTGTGCAAGGAGGCCAGATCACCATTAACCCCGACACCATCGACATGGATTTACTTCAAGCCTATCT
 Q Q Q Q N I L L Q G G Q I T I N P D T I D M D L L Q A Y L 527
 CCAGGATGCACAAGGAAGTAGCAGTGACGCCCTATCCGCTGACCTGCTGGACGAAACGTATGATCCAACCTGTTGCAGCGATGGAGAG
 Q D A Q G S S S D A L S A D L L D E T Y D P T V A A M E S 556
 TGTGTGAGCAACACCCAGCCAATGAATCATCCTGGTTCATTTGCTGCCACACAAGAGAGTTTACAGGGGCTAAGTGAGAACTCT**TG**
 V S S N T Q P M N H P G S F A A T Q E S L Q G L S E N S 584

AACACTGAACAATGTCTGGACATTTTGTTTTATACTTTGTGTGCATCAAGATGAATTGGTATCCATTTATTGTGAAATA
AATGTGAATACCGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQNO2

```

1 gatcaggaag gttgtgagca tatttagggt actagtacac cagcagtagt ggtctaccac
61 taacttgtca acaatgacga ctctcagctc agatttctgc ctggatgacg tgtctgctgt
121 gcagctacca agtggcgagc ttgagagata tattcaaaca aactttggat tacctgaaga
181 acaaccagtc caggccactc aagaaatgaa tggtcagggt ccatcacaag tccagactgg
241 agtcgagggg ggcatgggtc gtcagggtaca gtcaccgatg ttctctagtg ctgctctcac
301 gtcagaacca gcacctcagc aagcacctgc tcgctcaagc aaccagccat acatggaaat
361 agtcgagcaa ccccgatcac ggggactgcg gttccgctac gagtgtgagg gacgatctgc
421 tggcagcata ccgggggaac acagctcctc tgaaagaaag actttcccca cgataaagat
481 acgtaattat aagggccagc ctatagtagt agtttcgtgc gtgaccaaag atcctcacc
541 acactgtaag ccacatccac attctcttgt ggggaaagac tgtaagaaag gcgtatgcac
601 agtaaaggtc aaggacacag atacgataac atttctctat ctgggcattc agtgtgcca
661 gaagaaggat gtggaaaaca gtttaaagct gagaaaagat attaattgtg acccttttca
721 gactggtttc aatcatggca taggtcaaat tgacctgaac atgggtccgtc tgtgtttcca
781 agtcttctg cctgatgcaa gtggcaagat caccagagtt gtccccctg tgggtgtcaca
841 actcatccat gataaaaagt ctgtcaacga gctgacaata tgccgtgtcg atcgcagttc
901 ggggaaggca aaaggtggag atgagatctt ctttctgtgt gaaaaatta acaaagatga
961 tatccaggtc cgattcttta aagacacagc tgctggttgc atgtgggaag actttggtga
1021 ttttggacag ggggacgtgc atagacagtt tgctgtctgt ttcaagacc cacttacaa
1081 agaagcattc atacagcaac cagtagacgt gcagatgcag ctgagacgac cgtctgacaa
1141 tgaaacctcg gaatcgattc cgttacttta catgccggag gatcctgac cagatagaat
1201 tgaggagaaa aggaagcgca aagcagccca ctttgttcag aactgggggtg gttcagtgag
1261 tgagagaggg aatgccacag tcaaagaagg gttgcggacg aagctgagag ccaatcgag
1321 gatcaaacag gaaggagagc cgatggtgca agatgaactg cccagatatt ctttcacaa
1381 caccggcgcc agtgctacag caggcagcat gacaggtatg cccacgatga acatccgcac
1441 agcggacaac actgccatgg ggagcatgac cgtctccaac acaacgtcca cggcacccaa
1501 cccccagttt cagaacttga ggatcgacca cacagggaat gtaattgaca gctcggctgt
1561 tcagaaccaa cagcagcaga acatcctgct gcaaggaggc cagatcacca ttaacccga
1621 caccatcgac atggatttac ttcaagccta tctccaggat gcacaaggaa gtagcagtga
1681 cgccctatcc gctgacctgc tggacgaaac gtatgatcca actgttgag cgatggagag
1741 tgtgtcgagc aacaccagc caatgaatca tcctggttca tttgtgcca cacaagagag
1801 tttaacaggg ctaagtgaac actcttgaac actgaacaat gtctggacat tttgtttat
1861 actttgtgtg catcaagatg aattggtatc catttattgt gaaataaatg tgaataccgt
1921 caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

```

专利名称(译)	九孔鲍NF - κB抗体的制备及其检测方法		
公开(公告)号	CN101205254A	公开(公告)日	2008-06-25
申请号	CN200710070419.4	申请日	2007-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	吴信忠 姜玉声 吴刘记		
发明人	吴信忠 姜玉声 吴刘记		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53		
代理人(译)	陈祯祥		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

九孔鲍NF - κB(Ab - Rel)抗体的制备及其检测方法。按Ab - Rel全长cDNA序列,设计用于扩增RHD和TD片段的寡聚核苷酸引物,获得编码框表达载体pGEX - RHD和pGEX - TD;转化大肠杆菌重组蛋白的表达与鉴定,经凝胶亲和柱纯化后,注射家兔得到Ab - Rel的RHD和TD两个多克隆抗体,用间接夹心ELISA检测抗体的效价;用两种抗体对Ab - Rel的RHD和TD进行蛋白印迹(Western blotting)检测;亦可利用双抗体与二抗联用间接夹心酶联免疫反应试验(ELISA)检测Ab - Rel的RHD和TD。本发明提供一种对养殖贝类,特别是九孔鲍免疫因子的检测技术。

GATCAGGAGGTTGTGAGCATATTAGGGTACTAGTACACACAGAGTAGTGGTCTACCACTAACTTGTCAACAGGACGACTCTCAG 5
CTCAGATTCTCGGCTGATGATCTGCTGCTGCTGACGCTACCAAGTGGCGAGTTGAGAGATATATTCAAACAACTTGGATACG 34
SDFCLDDDL SAVQLPSGELERYIQTNFGLP 34
TGAGAGACACCACTCAGGCACTCAGAAATGAATGTCAGGGTCCATCAGAACTCCAGACTGGAGTTCAGGGGGGATGTTCCG 63
ESQBVQATQEMNGSGPSPQVQTCVQGGMVSR 63
TCAGGTACAGTACCGATGTTCTCTAGTGTCTCTCAGCTCAGACCGACCTCCAGCAAGCACTCTCGCTCAAGAACACAGCC 92
QVQSGMFSSAALTSEPAFQQA PARSSNQ 92
ADAGTGAATAGTGGAGCAGCCGATCTCGGGGACTCGGTTCCGCTACGAGTGGAGGAGCATCTCTCTGGAGATACGGG 121
YMEIV EQPQS [G]LRFYEC [E]RSAGSIPG 121
GGAACACAGCTCATCTGAAGAAAGACTTCCCGACGATAGATAGTATATATAAGGGCCGAGCTATAGTAGTATTCTCGCTGCT 150
EHSSEERKTFFPTIRINRYKGPALIVVVVSCV 150
GACCAAGATCTCTACCTCACTCTGAGGCGCATCCGATCTCTCTCTGGGAAAGACTGTGAAGMAGGCTATTGCACTAAGGCT 179
TKDPHPHCKEPHPHSLVGVKDCCKRGVCTV 179
CAGGACAGAGATACATAGATTCTCTGATCTGGGCTTCAGTGTCCACAGAGAGAGATGGGAAAGACTTTAAGGCTGAGAA 208
KDTDTTTFPHLGSGCAKKKFDVENSLEK 208
AGATATTAGTGGACCCCTTTCAGACTGGTTCAATCATGGCATAGTCAAAATTCAGCTGAAGATGGTCCGCTGTGTGTCAGAT 237
DINVDPFQTGFGFNHIGIQIDLNMVRLCFQV 237
CTTCTGCTGATCAGGTGGAGATACACAGATTCTGCGGCTGTGGTGTGACAGCTCATGATATAGAAAGCTTCTCAGAG 266
FLPDA SGRITR VVPPVVVSQSLHDKSVNE 266
SGTGAATATGCGGCTCGATCGAGTTCGGGGAAGGCAAAAGGTGGAGATAGATCTTCTCTGTGTGAAAAATTAAGAAAGA 295
LTI C R V D R S S O K A R G G D E I F L L C E K I N R D 295
TGAATCCGAGTCCGATCTCTTAAAGACAGACTGCTGGTGGTGGTGGGAGACCTGGTGGTGGTGGTGGGAGGGGAGCTCGATG 324
DIQVRFEKDTAAGCMMWEDFGDFGQGDVHR 324
ACAGTCTCTGTGTGAGACCCGACTTACAAAGAGGATTCATACAGAGAACAGTACAGCTGACAGTGCAGTGTGAGACGAGC 353
QFAVVFRTPFPYREAFIQQPFVDVQHOLRRP 353
GTGTGAATGAAAGCTCGAATCGATCTCGCTCTCTAGATGCGGAGAGATCTCTGATCCAGATAGAAATTAAGAGAAAGAGAG 382
S D N E T S E S I P F T Y M P E D P D P D R I [E] E K R K [R] 382
CAAGACGCCACTTTGTCAGAACTGGGTGGTTCAGTGAAGTGAAGAGAAATGGCACATTCAAAGAGAGGTTCGAGCAAACT 411
KAAH F V Q N W G G S V S E R G N A T V K E G L R T K L 411
GAGACCAATCGAGGATCAACAG 440
RANRRIKQEGEGEFMVQDELFERYSFNTNGAS 440
TCTACAG 469
ATAAGSMTGMPTMNNIRTADNTAMGSMTVSN 469
CACACGTCAGCGCACCCAGCCCGATTTAGAACTTGAGATCAGCACAGAGGGAATGTAATTGACAGCTCGGCTGTGAGAA 499
TSTAPNPQFQNLRIDHTGNVIDSSAVQN 499
CQACAGCAGCAGAGAGATCTCTGTCAGAGAGGCGAGTACAGCTTACCCCGACACTTCAGAGAGATTTACTTCAAGCTATCT 527
QOQONILLQGGQITINPDTIDMDLLQAYL 527
CGAGATCAGCAG 556
QDAQGSSSDALSDLLDETYDPTTVARMS 556
TGTGTGAGCAACCCAGCAATCATCTGGTTCATTGTCTCCACACAGAGAGTTTACAGGGGCTAAGTGAAGACTCT 584
VSSNTQPMNHFGSFAATQESLQGLSENS 584