



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104558173 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201510017441. 7

(22) 申请日 2015. 01. 13

(71) 申请人 广东海大畜牧兽医研究院有限公司
地址 510000 广东省广州市番禺区沙头街福平路八街 5 号(仅限办公用途)

(72) 发明人 李中圣 徐晓鹏 乔晶鑫 何永龙 侯月娥

(74) 专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标事务所(普通合伙) 44288
代理人 罗伟添

(51) Int. Cl.

G07K 16/18(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

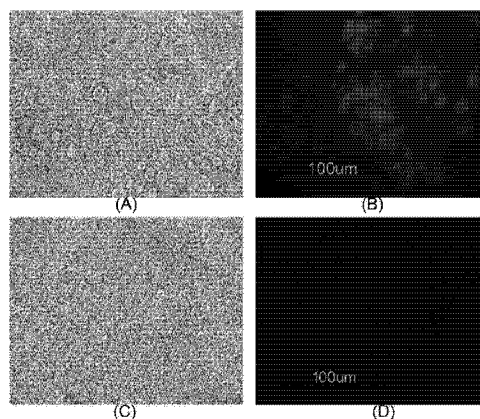
权利要求书2页 说明书7页
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体及其制备和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体及其制备和应用;所述检测传染性脾肾坏死病毒抗体为纯化的兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体,是以含有序列号为 SEQ ID NO:1 的一段氨基酸残基为表位抗原,获得特异性识别 ISKNV-23P8 的多克隆抗体。该抗体用于检测传染性脾肾坏死病毒,具有特异性。本发明所述的传染性脾肾坏死病毒免疫荧光检测试剂盒及传染性脾肾坏死病毒感染印片非诊断性的免疫荧光快速检测方法具有特异性好、操作简单、快速、灵敏的特点,较 PCR 方法有明显优势,全部操作可在 1.5 小时内完成,可用于各种易感鱼类养殖过程中的 ISKNV 感染检测。



1. 一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体,其特征在于,其为兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体,是以含有序列号为 SEQ ID NO:1 的一段氨基酸残基为表位抗原,获得特异性识别 ISKNV-23P8 的多克隆抗体。

2. 一种如权利要求 1 所述的检测传染性脾肾坏死病毒的抗体的制备方法,其特征在于,利用 Antigenic 和 DNASTAR/protean 抗原决定簇分析软件对传染性脾肾坏死病毒毒株编码的膜蛋白 VP23R 的氨基酸序列进行分析,筛选出一段 14 个氨基酸残基抗原表位的多肽片段,并以该多肽片段制备抗 VP23R 蛋白的兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体,所述多肽片段的序列为 SEQ ID NO:1。

3. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于,其具体步骤如下:

1) 合成多肽:以上述多肽片段为模板,用生物学方法合成多肽,用 HPLC 对合成的多肽进行纯化,纯度在 85%以上;

2) 耦联:将上述步骤 1) 合成多肽耦联至钥孔血蓝蛋白中,获得 23P8-KLH 复合物;

3) 乳化:用弗氏完全佐剂对上述步骤 2) 得到的 23P8-KLH 复合物进行乳化;

4) 免疫:用上述步骤 3) 的乳剂免疫新西兰大白兔,背部皮下多点注射,首免后 10-15 天,用弗氏不完全佐剂乳化的 23P8-KLH 进行一次加强免疫;

5) 血清抗体的检验与制备:加强免疫后 7 天,用 Western-blotting 检测兔血清中特异抗体的生成情况;

6) 亲和层析:利用 ISKNV-23P8 耦联的琼脂糖凝胶对血清中特异抗体进行亲和层析,获得兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体。

4. 根据权利要求 3 所述的制备方法,其特征在于,步骤 5) 的具体方法为:以 ISKNV 感染 48 小时后的 MFF-1 细胞培养上清为样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印至硝酸纤维素膜,用 10%脱脂奶粉封闭硝酸纤维素膜,37°C,1h;然后分别加入 1:4000 倍稀释的兔血清,4°C,过夜后,用 TBST 清洗 3 次硝酸纤维素膜;然后加入 2000 倍稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 二抗,37°C,1h,用 TBST 清洗 3 次硝酸纤维素膜,用 DAB 显色试剂进行显色;待分子量为 200KDa 的蛋白显色则判定为 ISKNV-23P8 血清抗体阳性;通过耳部静脉血管采集兔子血液,室温下放置 1 小时后,4°C,过夜,3000rpm 离心 5 分钟,收集血清。

5. 一种检测传染性脾肾坏死病毒的免疫荧光检测试剂盒,其特征在于,其包含如权利要求 1 所述的检测传染性脾肾坏死病毒的抗体。

6. 一种传染性脾肾坏死病毒感染非诊断性的印片免疫荧光快速检测方法,包括以下步骤:

1) 疑似染病组织处理:取疑似 ISKNV 感染的病鱼脾脏组织,以刀片切开脾脏,在载玻片上印片;

2) 固定:以 4%多聚甲醛溶液覆盖上述载玻片,室温固定 3-10min;

3) 封闭:经步骤 2) 固定后的载玻片用含有 1%牛血清白蛋白的 PBST 溶液于室温封闭 10-20min;

4) 抗体孵育:经步骤 3) 处理后的载玻片加入用 PBST 以体积比为 1:1000-3000 比例稀释的权利要求 1 所述的检测传染性脾肾坏死病毒的抗体,室温抚育 30-50min,再以 PBST 充分洗涤;

5) 荧光标记:上述步骤 4) 处理后的载玻片加入荧光标记的羊抗兔 IgG 二抗,抚育

20-40min,再用 PBST 洗涤;

7) 检测荧光信号:载玻片经荧光标记后,用盖玻片封片,免疫荧光显微镜检测,检测荧光信号。

7. 根据权利要求 6 所述的免疫荧光快速检测方法,其特征在于:步骤 1) 所使用的载玻片经硅化或经多聚赖氨酸处理。

8. 根据权利要求 6 所述的免疫荧光快速检测方法,其特征在于:步骤 1) 中,所述以新鲜脾脏的剖切面在载玻片上进行印片。

9. 根据权利要求 6 所述的免疫荧光快速检测方法,其特征在于:步骤 5) 中,所述羊抗兔 IgG 二抗采用 FITC 荧光标记。

一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体及其制备和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物免疫技术领域,具体涉及一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体及其制备和应用。

背景技术

[0002] 传染性脾肾坏死病毒 (Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus, ISKNV) 是虹彩病毒科 (Iridoviridae) 肿大细胞病毒属 (Megaloctivirus) 的代表种,是一类具有正二十面体的胞浆型大型双链 DNA 病毒,基因组由 111,362 个碱基组成,包括 125 个预测开放读码框 ORF (open reading frames)。ISKNV 可以感染近 60 种淡水和海水鱼,是鳊、加洲鲈和美国红鱼养殖业的巨大威胁,鳊鱼是其主要感染宿。

[0003] 鳊 (Siniperca chuatsi) 是鲈形目真鲈科鳊属的鱼类,俗称鳊鱼、花鲫鱼、桂鱼、季花鱼等,是中国特产的一种食用淡水鱼,也是我国重要的淡水鱼特色养殖品种之一;由传染性脾肾坏死病毒 (Infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) 引起的鳊鱼虹彩病毒病是鳊鱼养殖的主要疫病,导致顿死亡率接近 100%,成为制约鳊养殖业发展的主要瓶颈。自 1994 年以来,ISKNV 引起了广东省的鳊养殖重大经济损失,其传染力强,发病率高达 30%,致死率高达 90% 以上,平均每年经济损失高达 2 亿元。对 ISKNV 的感染进行检测,是防止该病毒病暴发的必要手段。目前国内外针对该病毒的诊断方法局限于聚合酶链式反应 (PCR) 技术,尚未有其它诊断方法的报道,PCR 检测法需要提纯病鱼组织 DNA,且假阳性率较高,限制了该方法的推广和使用。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种检测传染性脾肾坏死病毒抗体,以多肽为抗原获得特异性的传染性脾肾坏死病毒抗体,该多肽序列与虹彩病毒属其它种病毒的同源性较低,无连续 5 个以上氨基酸相一致,该抗体用于检测传染性脾肾坏死病毒,具有特异性。

[0005] 为解决上述问题,本发明所采用的技术方案如下:

[0006] 一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体,其为兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体,是以含有序列号为 SEQ ID NO:1 的一段氨基酸残基为表位抗原,获得特异性识别 ISKNV-23P8 的多克隆抗体。

[0007] 本发明还提供了一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体的制备方法,通过该方法获得一种特异性识别 ISKNV 的多克隆抗体,用于荧光免疫检测传染性脾肾坏死病毒。

[0008] 为实现上述目的,本发明中所述的制备方法的具体方案如下。

[0009] 一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体的制备方法,利用 Antigenic 和 DNA star/protean 抗原决定簇分析软件对传染性脾肾坏死病毒毒株编码的膜蛋白 VP23R 的氨基酸序列进行分析,筛选出一段 14 个氨基酸残基抗原表位的多肽片段,并以该多肽片段制备抗 VP23R 蛋白的兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体;所述多肽片段的序列为 SEQ ID NO:1。

[0010] 具体地,所述的制备方法包括以下步骤:

[0011] 1) 合成多肽:以上述多肽片段为模板,用生物学方法合成多肽,用 HPLC 对合成的多肽进行纯化,纯度在 85%以上;

[0012] 2) 耦联:将上述步骤 1) 合成多肽耦联至钥孔血蓝蛋白 (KLH) 中,获得 23P8-KLH 复合物;

[0013] 3) 乳化:用弗氏完全佐剂对上述步骤 2) 得到的 23P8-KLH 复合物进行乳化;

[0014] 4) 免疫:用上述步骤 3) 的乳剂免疫新西兰大白兔,背部皮下多点注射,首免后 10-15 天,用弗氏不完全佐剂乳化的 23P8-KLH 进行一次加强免疫;

[0015] 5) 血清抗体的检验与制备:加强免疫后 7 天,用 Western-blotting 检测兔血清中特异抗体的生成情况;

[0016] 6) 亲和层析:利用 ISKNV-23P8 耦联的琼脂糖凝胶对血清中特异抗体进行亲和层析,获得兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体。

[0017] 进一步地,步骤 5) 的具体方法为:以 ISKNV 感染 48 小时后的 MFF-1 细胞培养上清为样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印至硝酸纤维素膜,用 10% 脱脂奶粉封闭硝酸纤维素膜,37°C,1h;然后分别加入 1:4000 倍稀释的兔血清,4°C,过夜后,用 TBST 清洗 3 次硝酸纤维素膜;然后加入 2000 倍稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 二抗,37°C,1h,用 TBST 清洗 3 次硝酸纤维素膜,用 DAB 显色试剂进行显色;待分子量为 200KDa 的蛋白显色则判定为 ISKNV-23P8 血清抗体阳性;通过耳部静脉血管采集兔子血液,室温下放置 1 小时后,4°C,过夜,3000rpm 离心 5 分钟,收集血清。

[0018] 一种检测传染性脾肾坏死病毒的免疫荧光检测试剂盒,其包含本发明所述的检测传染性脾肾坏死病毒的抗体。

[0019] 本发明还提供了一种传染性脾肾坏死病毒感染非诊断性的印片免疫荧光快速检测方法,该方法具有特异性好、操作简单、快速、灵敏的特点,较 PCR 方法有明显优势,全部操作可在 1.5 小时内完成,可用于各种易感鱼类养殖过程中的 ISKNV 感染检测。

[0020] 一种传染性脾肾坏死病毒感染非诊断性的印片免疫荧光快速检测方法,包括以下步骤:

[0021] 1) 疑似染病组织处理:取疑似 ISKNV 感染的病鱼脾脏组织,以刀片切开脾脏,在载玻片上印片;

[0022] 2) 固定:以 4% 多聚甲醛溶液覆盖上述载玻片,室温固定 3-10min;

[0023] 3) 封闭:经步骤 2) 固定后的载玻片用含有 1% 牛血清白蛋白的 PBST 溶液于室温封闭 10-20min;

[0024] 4) 抗体抚育:经步骤 3) 处理后的载玻片加入用 PBST 以体积比为 1:1000-3000 比例稀释的本发明所述的检测传染性脾肾坏死病毒的抗体(即特异性识别 ISKNV-23P8 的多克隆抗体),室温抚育 30-50min,再以 PBST 充分洗涤;

[0025] 5) 荧光标记:上述步骤 4) 处理后的载玻片加入荧光标记的羊抗兔 IgG 二抗,抚育 20-40min,再用 PBST 洗涤;

[0026] 7) 检测荧光信号:载玻片经荧光标记后,用盖玻片封片,免疫荧光显微镜检测,检测荧光信号。

[0027] 具体地,步骤 1) 所使用的载玻片经硅化或经多聚赖氨酸处理。

[0028] 具体地,步骤 1) 以新鲜脾脏的剖切面在载玻片上进行印片。

[0029] 具体地,步骤 5) 中,所述羊抗兔 IgG 二抗采用 FITC 荧光标记。

[0030] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0031] 1. 本发明所述的检测传染性脾肾坏死病毒抗体可特异性识别 ISKNV VP23R 的条带,与不含有 VP23R 的蛋白之间无交叉反应;

[0032] 2. 本发明所述的检测传染性脾肾坏死病毒的免疫荧光检测试剂盒利用特异性识别 ISKNV 编码的特有细胞膜定位蛋白 VP23R 的多克隆抗体,对病鱼组织中病毒感染细胞进行免疫荧光检测,具有特异性好、操作简单、快速、灵敏等优点;

[0033] 3. 本发明所述的传染性脾肾坏死病毒感染非诊断性的印片免疫荧光快速检测方法具有特异性好、操作简单、快速、灵敏的特点,较 PCR 方法有明显优势,全部操作可在 1.5 小时内完成,可用于各种易感鱼类养殖过程中的 ISKNV 感染检测。

[0034] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

附图说明

[0035] 图 1 为鳊脾脏组织切片的免疫荧光图;其中, A、B 为感染 ISKNV 的鳊脾脏组织切片,其中 B 为激发光下的荧光细胞,可见本发明的兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体可特异性识别 ISKNV 感染的脾脏组织细胞;C、D 为健康鳊脾脏组织切片,其中 D 为激发光下的组织细胞,未感染 ISKNV 的健康鱼脾脏组织无荧光信号;

[0036] 图 2 为 ISKNV 感染发病的鳊鱼脾脏组织印片免疫荧光检测结果图;其中 A 图为激发光下的荧光图, B 图为白光下图片;

[0037] 图 3 健康鳊鱼脾脏组织印片免疫荧光检测结果图, A 为激发光下的荧光图, B 为白光下图片;

[0038] 图 4 为鳊脾脏组织样品 Western-blotting 结果图;泳道 1:: 感染 ISKNV 的鳊脾脏组织;泳道 2:健康鳊脾脏组织;

[0039] 图 5 为,其中 a 图为激发光下的荧光图, b 图为白光下图片

[0040] 图 6 为,其中 a 图为激发光下的荧光图, b 图为白光下图片。

具体实施方式

[0041] 一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体,其为兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体,是以含有序列号为 SEQ ID NO:1 的一段氨基酸残基为表位抗原,获得特异性识别 ISKNV-23P8 的多克隆抗体。

[0042] 一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体的制备方法,利用 Antigenic 和 DNA star/protean 抗原决定簇分析软件对传染性脾肾坏死病毒毒株编码的膜蛋白 VP23R 的氨基酸序列进行分析,筛选出一段 14 个氨基酸残基抗原表位的多肽片段,并以该多肽片段制备抗 VP23R 蛋白的兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体;所述多肽片段的序列为 SEQ ID NO:1。

[0043] 以下是本发明具体的实施例,在下述实施例中所涉及的

[0044] 实施例 1

[0045] 一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体,通过以下方法获得:

[0046] 1) 获取多肽片段:利用 Antigenic 和 DNASTAR/protean 等抗原决定簇分析软件

对传染性脾肾坏死病毒 (infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) 毒株 (NCBI 登陆号 :AF371960) 编码的膜蛋白 VP23R 的氨基酸序列进行分析,筛选出一段 14 个氨基酸残基的抗原表位 :ISKNV-23P8 (SEQ ID NO:1);生物信息学分析显示,该多肽序列与虹彩病毒属其它种病毒的同源性较低,无连续 5 个以上氨基酸相一致;

[0047] 2) 制备抗 VP23R 蛋白抗体

[0048] ①合成多肽:以步骤 1 所得到的 ISKNV-23P8 多肽片段为模板,用生物学方法合成多肽,然后用 HPLC 对合成的多肽进行纯化至纯度为 85% 以上;

[0049] ②耦联:将纯化后的多肽耦联至钥孔血蓝蛋白 (KLH) 蛋白,得到多肽-KLH 复合物;

[0050] ③用弗氏完全佐剂对制备的多肽-KLH 复合物进行乳化;

[0051] 4) 免疫:用上述步骤 3) 的乳剂免疫新西兰大白兔,背部皮下多点注射,首免后 10-15 天,用弗氏不完全佐剂乳化的 23P8-KLH 进行一次加强免疫;

[0052] 5) 血清抗体的检验与制备:加强免疫后 7 天,用 Western-blotting 检测兔血清中特异抗体的生成情况,具体方法为:以 ISKNV 感染 48 小时后的 MFF-1 细胞培养上清为样品进行聚丙烯酰胺凝胶 (Western-blotting) 电泳,转印至硝酸纤维素 (NC) 膜 (PALL),用 10% 脱脂奶粉封闭 NC 膜,37°C, 1h;然后分别加入 1:4000 倍稀释的兔血清,4°C,过夜后,用 TBST 清洗 3 次 NC 膜;然后加入 2000 倍稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 二抗 (KPL),37°C, 1h,用 TBST 清洗 3 次 NC 膜,用 DAB 显色试剂 (Life Technologies) 进行显色;若有分子量为 200KDa 的蛋白显色则判定为 ISKNV-23P8 血清抗体阳性;通过耳部静脉血管采集兔子血液,室温下放置 1 小时后,4°C,过夜,3000rpm 离心 5 分钟,收集血清;

[0053] 6) 亲和层析:利用 ISKNV-23P8 耦联的琼脂糖凝胶对血清中特异抗体进行亲和层析,获得兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体。

[0054] 检测传染性脾肾坏死病毒的抗体 (兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体) 效果检测

[0055] 1. 特异性检测

[0056] 用石蜡切片免疫荧光法分析抗体特异性,具体方法为:分别取 ISKNV 感染鳃脾脏组织和健康鳃脾脏组织,制作石蜡切片,抗原修复后,用含 2% BSA 的 TBST 封闭,37°C, 1h;然后分别加入 1:2000 倍稀释的实施例 1 所获得特异性识别 ISKNV-23P8 的兔 IgG 多克隆抗体,4°C,过夜后,用 TBST 清洗 3 次;然后加入 2000 倍稀释的 FITC-羊抗兔 IgG 二抗 (KPL),37°C, 1h,用 TBST 清洗 3 次,然后用甘油封片;荧光显微镜下观察,结果参见图 1。

[0057] 图 1 结果显示,纯化制备的兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体可特异性识别 ISKNV 感染的脾脏组织细胞 (A, B),由于 VP23 为膜蛋白,荧光信号在细胞膜上较强,细胞显著肿大,符合 ISKNV 感染特征;无 ISKNV 感染的脾脏组织细胞无荧光图 1 (C, D)。说明纯化抗体与感染细胞免疫反应的特异性好。

[0058] 2. 效价检测

[0059] 将 ISKNV-23P8 多肽片段与 BSA 进行耦联,得到 ISKNV-23P8/BSA 耦联物,用碳酸包被液稀释耦联物至 200ng/mL;分别以 ISKNV-23P8/BSA 耦联物和 ISKNV-23P8 多肽片段为抗原包被聚苯乙烯反应板 (NUNC),100 μ L/孔,37°C 孵育 2h,300 μ L TBST 洗涤液洗三次;每孔加入 300 μ L 封闭液 (Pierce),37°C 孵育 1h,每孔加入 100 μ L 3000 倍稀释的兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体,37°C 孵育 1.5h,300 μ L TBST 洗涤液洗三次;每孔加入 100 μ L

2000 倍稀释的 HRP- 羊抗猪 IgG (KPL), 室温孵育 45min, 300 μ L TBST 洗涤液洗三次; 每孔加入 100 μ L ELISA 显色液, 室温避光孵育 10min; 每孔加入 100 μ L 2mol/L H_2SO_4 , 以终止反应, 应用酶标仪读取每孔在 OD₄₅₀ 的吸光值, 结果参见表 1。

[0060] 表 1: 特异性抗体的 ELISA 检测

[0061]

OD 值	包被抗原类型与浓度							
	ISKNV-23P8 (ng/mL)				ISKNV-23P8/BSA (ng/mL)			
多克隆抗体浓度 (μ g/mL)	1600	800	400	200	800	400	200	100
0.1	3.338	2.060	1.762	1.511	3.324	3.187	2.582	2.338
0.01	3.033	1.103	0.979	0.218	3.031	2.421	2.057	1.708
0.001	1.791	0.294	0.154	0.096	2.987	1.667	1.594	0.31
0.0001	0.401	0.108	0.067	0.081	2.410	0.425	0.311	0.158

[0062]

0.00001	0.257	0.078	0.057	0.079	2.165	0.370	0.207	0.130
空白 (NC)	0.093	0.08	0.057	0.079	0.129	0.106	0.102	0.115

[0063] 本法结合“棋盘滴定”展示了不同浓度抗原和抗体反应后 OD 值的情况, 表 1 的结果显示: 当抗原在某一浓度时, 随着兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体浓度的降低 OD 值下降。应用不同抗原进行固相包被的结果显示, ISKNV-23P8/BSA 耦联物与兔抗 ISKNV-23P8IgG 的反应性更好; 可见, BSA 提高了多肽片段的抗原性; 实验中空白对照 (NC) 为虎纹蛙病毒 (TFV) 免疫兔后制备的血清; 以上试验说明制备的兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体与特异性抗原的免疫反应良好。

[0064] 实施例 2

[0065] 一种传染性脾肾坏死病毒感染非诊断性的印片免疫荧光快速检测方法, 包括以下步骤:

[0066] 1) 取疑似 ISKNV 感染的病鱼脾脏组织, 以刀片切开脾脏, 将新鲜切面在硅化或多聚赖氨酸处理的载玻片上印数下, 风干;

[0067] 2) 以 4% 多聚甲醛溶液覆盖室温固定 3 分钟;

[0068] 3) 以 1% 牛血清白蛋白 (BSA) PBST 溶液于室温封闭 20 分钟;

[0069] 4) 以 1:1000 的比例, 用 PBST 稀释的兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体, 室温抚育 30 分钟, PBST 充分洗涤 3 次;

[0070] 5) 加入 FITC 荧光标记的羊抗兔 IgG 二抗 (KLH) 抚育 20 分钟, PBST 洗涤三次;

[0071] 6) 用盖玻片封片, 免疫荧光显微镜检测, 观察荧光信号。

[0072] 实施例 3

[0073] 一种传染性脾肾坏死病毒感染非诊断性的印片免疫荧光快速检测方法,包括以下步骤:

[0074] 1) 取疑似 ISKNV 感染的病鱼脾脏组织,以刀片切开脾脏,将新鲜切面在硅化或多聚赖氨酸处理的载玻片上印数下,风干;

[0075] 2) 以 4%多聚甲醛溶液覆盖室温固定 10 分钟;

[0076] 3) 以 1%牛血清白蛋白 (BSA)PBST 溶液,于室温封闭 10 分钟;

[0077] 4) 以 1:3000,用 PBST 稀释的兔抗 ISKNV-23P8IgG,室温抚育 50 分钟,PBST 充分洗涤 3 次;

[0078] 5) 加入 FITC 荧光标记的羊抗兔 IgG 二抗 (KLH),抚育 40 分钟,PBST 洗涤三次;

[0079] 6) 用盖玻片封片,免疫荧光显微镜检测,观察荧光信号。

[0080] 免疫荧光快速检测方法特异性检测

[0081] 1. 免疫荧光显微镜镜检

[0082] 按照上述实施例 2 的步骤,分别对 ISKNV 感染的鳊鱼和健康的鳊鱼脾脏组织进行检测;分别选择 ISKNV 感染鳊鱼脾脏组织和健康鳊鱼脾脏组织免疫荧光显微镜镜检;结果参见图 2 和图 3。

[0083] 参见图 2,应用制备的兔抗 ISKNV-23P8 多克隆抗体可以特异性识别鳊鱼脾脏中 ISKNV 感染细胞,图 2-A 为阳性组织可见明显的荧光细胞。图 3 结果显示:健康鳊鱼脾脏组织印片上无荧光信号。

[0084] 2. Western-blotting

[0085] 取 ISKNV 感染鳊鱼脾脏组织和健康鳊鱼脾脏组织,经组织破碎、SDS 上样缓冲液处理后,分别进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),转印至硝酸纤维素 (NC) 膜 (PALL),用 10%脱脂奶粉封闭 NC 膜,37°C,1h;然后分别加入 1:2000 倍稀释的实施例 1 所获得特异性识别 ISKNV-23P8 的多克隆抗体,4°C,过夜后,用 TBST 清洗 3 次 NC 膜;然后加入 2000 倍稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 二抗 (KPL),37°C,1h,用 TBST 清洗 3 次 NC 膜,用 DAB 显色试剂 (Life Technologies) 进行显色,结果参见图 4。

[0086] 图 4 结果显示,ISKNV 感染鳊鱼脾脏组织样品中可特异性识别病毒 VP23R 的条带 (200kDa),而健康鳊鱼脾脏组织蛋白中不存在 VP23R 表达,无交叉反应。

[0087] 应用实施例 1

[0088] 广东清远某鳊鱼养殖场,现场取疑似 ISKNV 感染的病鱼 35 尾,剖解、取脾脏,将新鲜切面在硅化处理的载玻片上印拓,自然风干;用 4%多聚甲醛溶液覆盖,室温下固定 5 分钟;以含有 1% BSA 的 PBST 溶液于室温封闭 15 分钟;滴加 1:1000PBST 稀释的抗 VP23R 抗体至印迹处,在湿盒中室温抚育 40 分钟,PBST 洗涤 3 次;加入 FITC 荧光标记的羊抗兔 IgG,孵育 25 分钟,PBST 洗涤三次;封片,免疫荧光显微镜下镜检,观察荧光信号。

[0089] 结果显示,应用本方法可以在 1.5 小时内对鳊的 ISKNV 感染进行快速诊断。鳊鱼脾脏中 ISKNV 感染细胞的细胞膜荧光着色图,应用 PCR 和 DNA 测序对该结果进行验证,两结果完全一致。对 35 份疑似 ISKNV 感染的鳊与脾脏组织分别进行印片免疫快速诊断,结合 PCR 检测和测序验证,结果,14 份 PCR 确诊为 ISKNV 阳性感染的样品中 (结果参见图 5),印片免疫荧光阳性检出数同样为 14 份 (结果参见图 6),两方法的诊断结果完全一致,印片免疫荧光检出率为 100%。

[0090] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式,不能以此来限定本发明保护的范围,本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范

[0001]

<110> 广东海大畜牧兽医研究院有限公司

<120> 一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体及其制备和应用

<130>

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<400> 1

Asp Gly Gly Ser Gly Met Asp Asp Tyr Asp Asp Ile Asp Glu

5

10

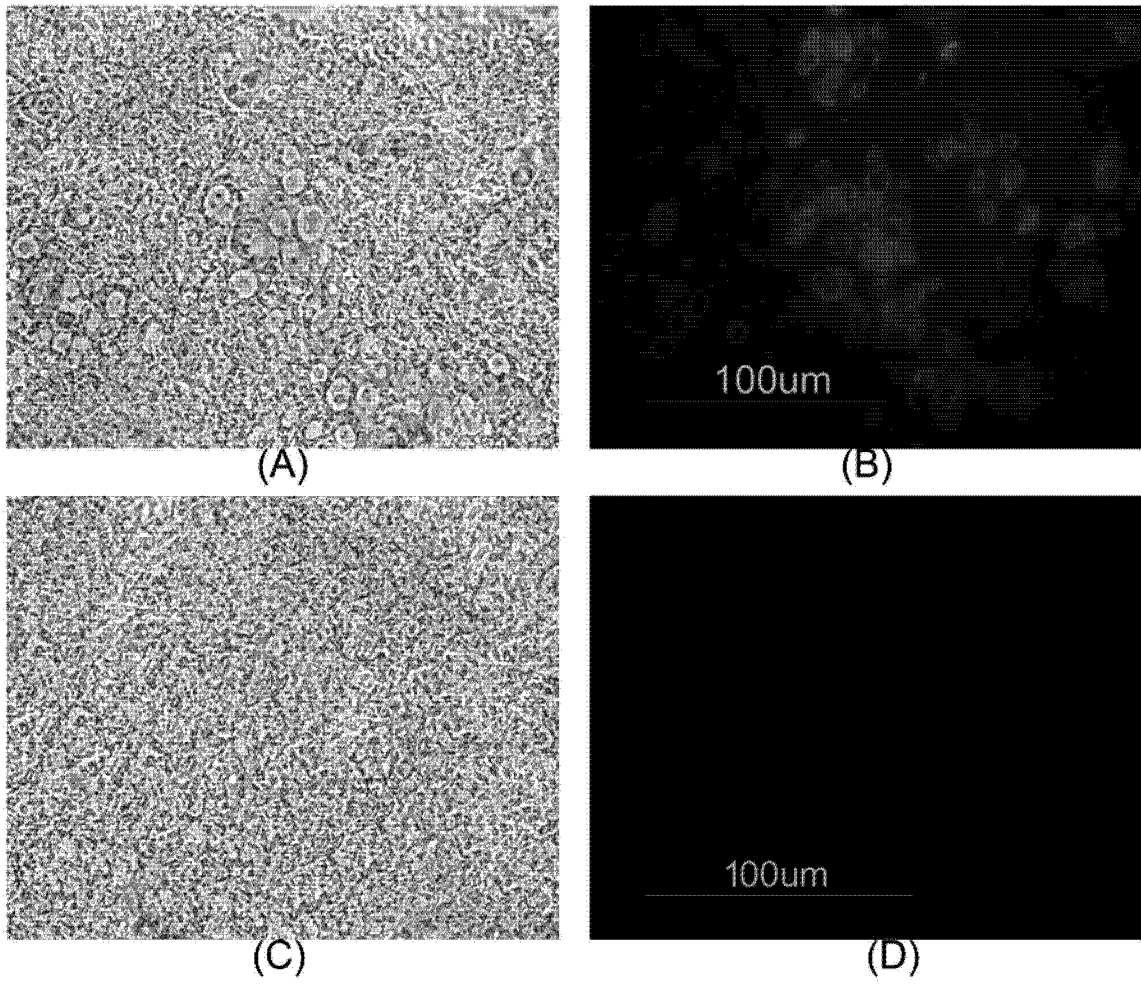


图 1

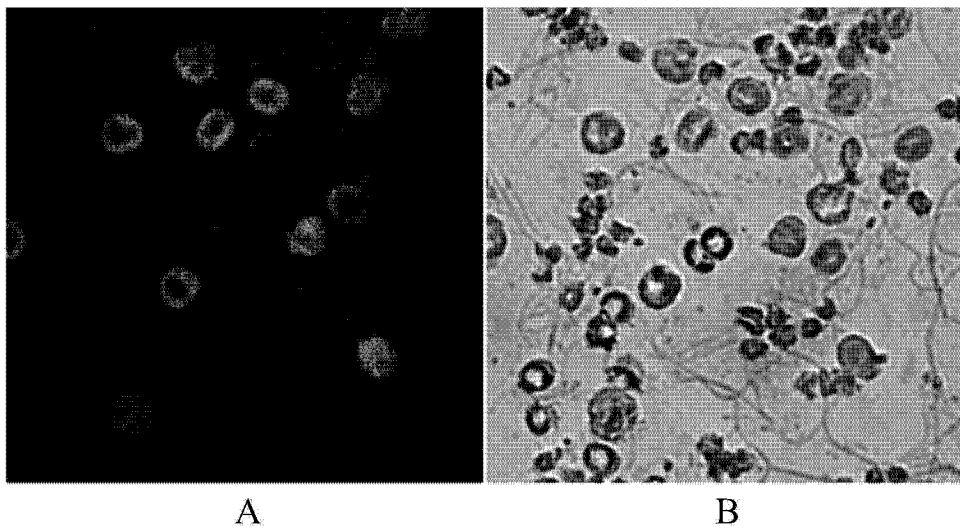


图 2

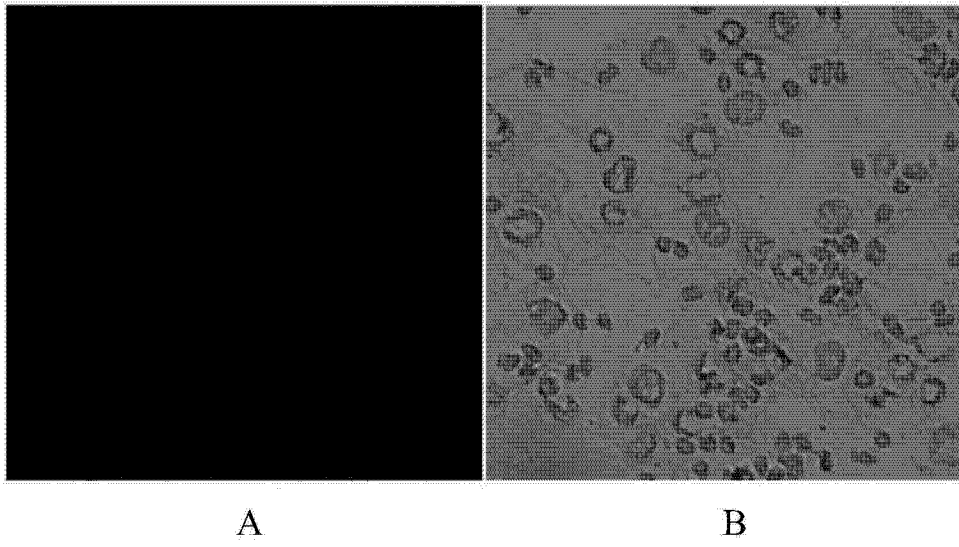


图 3

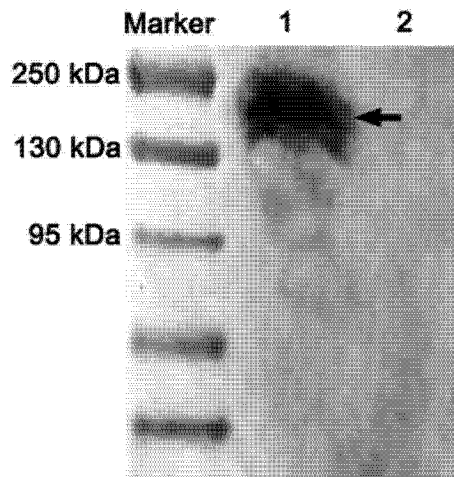


图 4

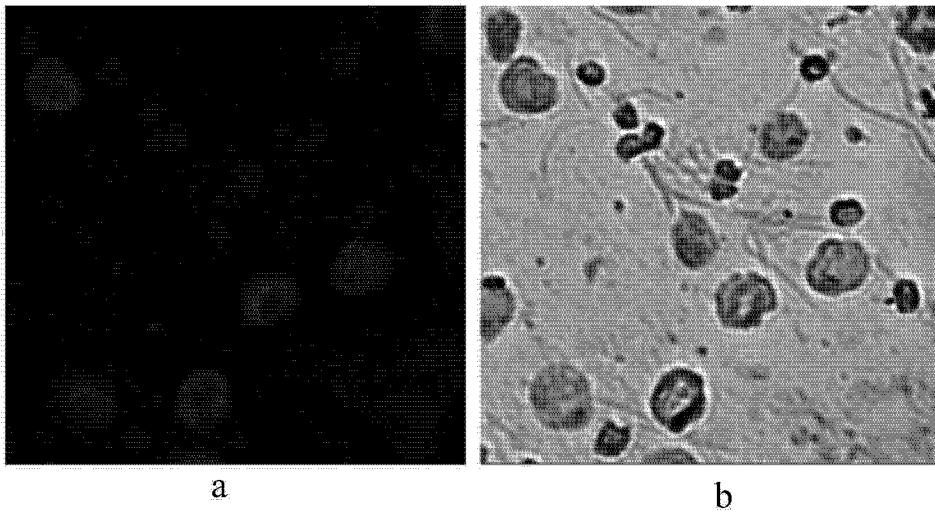


图 5

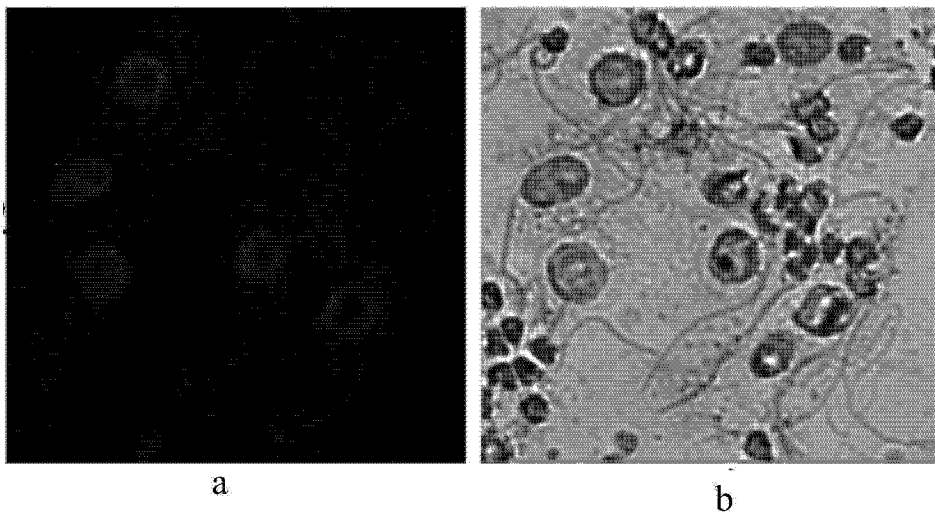


图 6

专利名称(译)	一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体及其制备和应用		
公开(公告)号	CN104558173A	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201510017441.7	申请日	2015-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	广东海大畜牧兽医研究院有限公司		
申请(专利权)人(译)	广东海大畜牧兽医研究院有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广东海大畜牧兽医研究院有限公司		
[标]发明人	李中圣 徐晓鹏 乔晶鑫 何永龙 侯月娥		
发明人	李中圣 徐晓鹏 乔晶鑫 何永龙 侯月娥		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/569 G01N33/533		
其他公开文献	CN104558173B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测传染性脾肾坏死病毒的抗体及其制备和应用；所述检测传染性脾肾坏死病毒抗体为纯化的兔抗ISKNV-23P8多克隆抗体，是以含有序列号为SEQ ID NO：1的一段氨基酸残基为表位抗原，获得特异性识别ISKNV-23P8的多克隆抗体。该抗体用于检测传染性脾肾坏死病毒，具有特异性。本发明所述的传染性脾肾坏死病毒免疫荧光检测试剂盒及传染性脾肾坏死病毒感染印片非诊断性的免疫荧光快速检测方法具有特异性好、操作简单、快速、灵敏的特点，较PCR方法有明显优势，全部操作可在1.5小时内完成，可用于各种易感鱼类养殖过程中的ISKNV感染检测。

