



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106565842 A

(43)申请公布日 2017.04.19

(21)申请号 201610990857.1

(22)申请日 2016.11.10

(71)申请人 中山大学

地址 510275 广东省广州市新港西路135号

(72)发明人 余新炳 周心怡 姜红焯 唐泽丽

孙恒昌 黄艳 陈庭金 林志鹏

任鹏丽

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 李艳 许亦琳

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

通用型淡水鱼多克隆抗体及其制备与应用

(57)摘要

本发明属于生物化学及分子免疫学领域,主要涉及通用型淡水鱼多克隆抗体及其制备与应用。本发明的第一方面提供了一种免疫组合物,所述免疫组合物含有草鱼IgM、鳙鱼IgM、鲫鱼IgM、鲤鱼IgM以及罗非鱼IgM。采用本发明的免疫组合物作为免疫抗原免疫动物获得多克隆抗体,所述多克隆抗体的效价在1:1000000 以上,不仅可以应用于草鱼、鲫鱼、鲤鱼、鳙鱼以及罗非鱼这五种鱼免疫应答水平的检测,还可以用于其他8种鱼免疫应答水平的检测。

1. 一种免疫组合物,所述免疫组合物含有IgM,所述IgM含有草鱼IgM、鳙鱼IgM、鲫鱼IgM、鲤鱼IgM以及罗非鱼IgM。
2. 根据权利要求1所述的免疫组合物,其特征在于,所述草鱼IgM、鳙鱼IgM、鲫鱼IgM、鲤鱼IgM以及罗非鱼IgM的质量比为1:1:1:1:1。
3. 根据权利要求1所述的免疫组合物,其特征在于,所述免疫组合物中还含有佐剂。
4. 如权利要求1~3任一所述的免疫组合物用于制备淡水鱼检测用多克隆抗体的用途。
5. 一种多克隆抗体,为以如权利要求1~3任一所述免疫组合物为免疫抗原制得。
6. 根据权利要求5所述的多克隆抗体,其特征在于,所述多克隆抗体为采用如权利要求1~3任一所述的免疫组合物作为免疫抗原免疫动物获得。
7. 根据权利要求6所述的多克隆抗体,其特征在于,所述动物选用家兔。
8. 如权利要求5~7任一所述的多克隆抗体在制备淡水鱼检测产品中的用途。
9. 一种淡水鱼检测试剂盒,所述试剂盒中含有固相载体以及位于固相载体上的如权利要求5~7任一所述的多克隆抗体。
10. 根据权利要求9所述的试剂盒,其特征在于,所述固相载体是包被板、试纸和/或微球。

通用型淡水鱼多克隆抗体及其制备与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物化学及分子免疫学领域,主要涉及通用型淡水鱼多克隆抗体及其制备与应用。

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,而硬骨鱼类的主要免疫球蛋白是IgM,这个分子是一个四聚体,每个单体包含2条重链和2条轻链。高度纯化的鱼类IgM在鱼类免疫研究中起到重要的作用,如制备单克隆抗体、多克隆抗体、检测鱼类病原体及鱼类免疫应答水平;探究IgM的形成、分布,还可以用于研究免疫系统的进化。

[0003] 淡水鱼类因其重要的营养价值和观赏价值而与人类关系密切,淡水鱼类所携带的病原对人类健康有严重的威胁,同时鱼类病害的发生也会给水产养殖也带来巨大的损失。因此,建立鱼类的血清学检测系统对突发传染病的溯源和鱼类病害的控制具有重要作用,有重大的社会和经济意义。

[0004] 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,严重影响了我国淡水鱼养殖产业的可持续发展,研究开发鱼类疫苗,对淡水鱼的养殖和病害预防有重要的意义。

[0005] 高纯度免疫球蛋白IgM及其抗体的制备是研究鱼类免疫系统、免疫检测方法的基础。目前,虽然已经有单种鱼类的抗体制备的相关文献报道,但并没有混合多种鱼类抗体制备免抗的相关报道,市面上也并没有免抗鱼类IgM抗体商品化出现,这在一定程度上阻碍了淡水鱼免疫应答水平的检测以及其免疫检测方法的建立。因此,有必要制备高纯度、高效价以及应用较广的免抗多种鱼IgM的混合多克隆抗体,为淡水鱼类病害防治研究提供工具。

发明内容

[0006] 为克服现有技术中的不足,本发明的目的在于提供一种通用型淡水鱼多克隆抗体及其制备与应用。

[0007] 为了实现上述目的及其他相关目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 本发明的第一方面提供了一种免疫组合物,所述免疫组合物含有IgM,所述IgM含有草鱼IgM、鳙鱼IgM、鲫鱼IgM、鲤鱼IgM以及罗非鱼IgM。

[0009] 优选地,所述草鱼IgM、鳙鱼IgM、鲫鱼IgM、鲤鱼IgM以及罗非鱼IgM的质量比为1:1:1:1:1。

[0010] 优选地,所述免疫组合物中还含有佐剂。

[0011] 本发明的第二方面提供了所述免疫组合物用于制备淡水鱼检测用多克隆抗体的用途。

[0012] 本发明的第三方面提供了一种多克隆抗体,为以所述的免疫组合物为免疫抗原制得。

[0013] 优选地,所述多克隆抗体为采用本发明的免疫组合物作为免疫抗原免疫动物获

得。

[0014] 优选地,所述动物选用家兔。

[0015] 本发明的第四方面提供了所述的多克隆抗体在制备淡水鱼检测产品中的用途。

[0016] 本发明的第五方面提供了一种淡水鱼检测试剂盒,所述试剂盒中含有固相载体以及位于固相载体上的前述多克隆抗体。

[0017] 优选地,所述固相载体是包被板、试纸和/或微球。

[0018] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0019] 本发明首次采用含有草鱼IgM、鳙鱼IgM、鲫鱼IgM、鲤鱼IgM以及罗非鱼IgM的免疫组合物来制备多克隆抗体,免疫家兔所需免疫球蛋白含量只是常规的五分之一,已经可以到达所需的效价水平。经ELISA检测效价在1:1000000以上,可以满足血清学检测的需要。与此同时,所制备的多克隆抗体不仅可以应用于草鱼、鲫鱼、鲤鱼、鳙鱼以及罗非鱼这五种鱼免疫应答水平的检测,还可以用于其他8种鱼免疫应答水平的检测。

附图说明

[0020] 图1:纯化后五种鱼IgM SDS-PAEG检测结果,其中,M:Marker;1:草鱼IgM;2:鳙鱼IgM;3:鲫鱼IgM;4:鲤鱼IgM;5:罗非鱼IgM。

[0021] 图2:采用含有草鱼IgM、鲫鱼IgM、大头鱼(亦即鳙鱼)IgM、鲤鱼IgM、罗非鱼IgM的免疫组合物免疫家兔三次后,第6周检测所获得的多克隆抗体血清效价,分别检测了兔抗血清对含有五种IgM免疫组合物以及单独IgM免疫抗原的效价,倍比稀释到16382400倍时兔抗鱼IgM抗血清OD值大于对照阴性血清OD值2.1倍,结果判定为阳性。

[0022] 图3:采用含有草鱼IgM、鲫鱼IgM、大头鱼(亦即鳙鱼)IgM、鲤鱼IgM、罗非鱼IgM的免疫组合物免疫家兔三次后,第7周检测所获得的多克隆抗体血清效价,分别检测了兔抗血清对含有五种IgM免疫组合物以及单独IgM免疫抗原的效价,倍比稀释到16382400倍时兔抗鱼IgM抗血清OD值大于对照阴性血清OD值2.1倍,结果判定为阳性。

[0023] 图4:纯化前后兔抗五种鱼IgM的IgG检测结果,其中,M:maker;1:rProteinA纯化的浓缩前兔IgG;2:rProteinA纯化的浓缩后兔IgG;3:PBS洗脱未结合蛋白;4:家兔穿透ProteinA血清;5:家兔血清。

[0024] 图5:13种鱼分别取1uI血清在SDS-PAGE上分离后转移到PVDF膜上,与1:2000兔抗混合5种鱼的抗体IgG杂交进行Western blot分析,其中,1:草鱼血清;2:鲫鱼血清;3:鲈鱼血清;4:太阳鱼血清;5:青竹皖血清;6:桂鱼血清;7:山斑鱼血清;8:黑鱼血清;9:黄骨鱼血清;10:边鱼血清;11:仓鱼血清;12:腊鱼血清;13:白鲢血清。

[0025] 图6:5种鱼分别取1uI血清在SDS-PAGE上分离后转移到PVDF膜上,与1:2000兔抗混合5种鱼的抗体IgG杂交进行Western blot分析,其中,1:草鱼血清;2:鲫鱼血清;3:鳙鱼血清;4:鲤鱼血清;5:罗非鱼血清。

具体实施方式

[0026] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其它优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离

本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0027] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0028] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0029] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见Sambrook等MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989 and Third edition,2001; Ausubel等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley& Sons, New York,1987 and periodic updates; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Woffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego,1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol.304, Chromatin (P.M.Wassarman and A.P.Woffe, eds.), Academic Press, San Diego,1999; 和 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol.119, Chromatin Protocols (P.B.Becker, ed.) Humana Press, Totowa,1999等。

[0030] 实施例1多克隆抗体的制备及效果检测

[0031] 一、血清的制备

[0032] 方法:选取健康的草鱼、鲫鱼、鲤鱼、鳙鱼以及罗非鱼各15条,尾静脉采血,室温静置1h,4℃过夜,4℃4000r/min离心20min,分装,-80℃保存。

[0033] 二、5种鱼类免疫球蛋白的分离纯化

[0034] 本实验采用重组蛋白A(rProteinA)亲和层析柱纯化鱼类免疫球蛋白。

[0035] 1、取鱼血清40mL,用平衡缓冲液PBS等体积稀释,4℃4000r/min离心20min取上清用0.45μm的过滤器处理;

[0036] 2、10倍柱体积平衡缓冲液PBS平衡柱子后上样,流速为1mL/min;

[0037] 3、为使IgM与rProteinA充分结合,将样本以1mL/min的流速反复过柱三次,并在柱床上4℃孵育2h,然后再用10倍柱体积平衡缓冲液PBS(20mmol/L PBS,pH=8.0,盐浓度3.0mol/L)洗脱未结合蛋白至A=0(OD280nm=0),6倍柱体积的0.1mol/L甘氨酸(PH=2.5)洗脱液洗脱目的蛋白,1mL分管收集;

[0038] 4、为防止蛋白变性立刻用中和液中和,每管加65μL的Tris-HCl中和液(pH=9.0)以达抗体稳定的PH值,PH=8.0;

[0039] 5、收集液经SDS-PAGE检测后合并,用PBS缓冲液透析,每隔6小时换掉三分之一透析液,透析24h(目的:把盐透析出来,将抗体保存在稳定的PBS缓冲液当中),用聚乙二醇

(PEG20000)浓缩蛋白,-80℃保存;

[0040] 6、用0.5M醋酸缓冲液3到5个柱体积,洗脱结合更牢固的蛋白,之后用10倍柱体积纯水冲洗,然后用5倍柱体积20%乙醇冲洗,并将柱子保存在20%乙醇中,放4℃保存。

[0041] 注意事项:

[0042] 1、纯化前所有缓冲液,样品及层析柱都必须预先放置至室温,以避免产生气泡;

[0043] 2、纯化前用0.45um滤膜过滤所有所需缓冲液体,样品需离心(12000r/min,30min),并过滤,以除去颗粒性物质;

[0044] 3、为确保层析柱的使用寿命和载量,及时清洗非常重要,必须做到现用现洗;

[0045] 4、清洗完成后用起始缓冲液重新平衡;

[0046] 5、层析柱保存于20%乙醇中,4℃长期保存;

[0047] 6、在装柱、使用和保存柱子时,要避免柱子干流,气泡进入;5ml rProtein A亲和层析柱购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司。蛋白A(proteinA)是A型金黄色葡萄球菌分离而得的一种细胞壁蛋白。它能特异与抗体的Fc区结合,所以将重组蛋白A偶联到琼脂糖凝胶6B得到的亲和色谱填料,可从腹水、培养液及血清等样品中一步纯化出高纯度的抗体。重组蛋白A和天然的蛋白A相比有更好的稳定性和更高的结合能力。

[0048] 三、鱼IgM抗体的检测

[0049] (1) 蛋白浓度的测定

[0050] 表1五种鱼血清中IgM浓度及含量

[0051]

鱼种	浓缩后IgM浓度 (mg/ml)	浓缩后血清体积 (ml)	IgM总量 (mg)	血清量 (ml)	IgM浓度 (mg/ml)
草鱼	0.56	5.6	3.136	40	0.078
鳊鱼	2.00	3.2	6.4	40	0.16
鲫鱼	0.68	4.2	2.856	40	0.071
鲤鱼	0.70	4.1	2.87	40	0.072
罗非鱼	0.93	4	3.72	40	0.093

[0052] (2) SDS-PAEG检测蛋白质纯化效果

[0053] 样品与上样缓冲液(60mmol/L的Tris-HCl,PH6.8,25%甘油,0.1%溴酚蓝,2%SDS,13-巯基乙醇14.4mmol/L)4:1(体积比)混合后,沸水中煮5min,每孔上样量10uL。浓缩电压80V,分离胶加大到120V,电泳1.5h,考马斯亮兰R-250染色1h,沸水中煮20min,观察结果。结果如图1所示,其中,M:Marker;1:草鱼IgM;2:鳊鱼IgM;3:鲫鱼IgM;4:鲤鱼IgM;5:罗非鱼IgM。

[0054] 四、兔抗血清的制备

[0055] 1、将7只大耳白兔暂养1周,1只作为空白对照,注射生理盐水;

[0056] 2、第一次免疫,其中5只大耳白兔分别注射草鱼IgM、鳊鱼IgM、鲫鱼IgM、鲤鱼IgM和罗非鱼IgM各200ug g;其中2只大耳白兔注射含有草鱼IgM、鳊鱼IgM、鲫鱼IgM、鲤鱼IgM以及罗非鱼IgM的免疫组合物,其中每种鱼的IgM各40ug。第二次免疫,所注射的免疫物质的含量

同第一次免疫。第三次免疫,所注射的免疫物质的含量为第一次免疫的一半。

[0057] 3、注射时,先将含IgM的溶液与完全弗氏佐剂进行1:1(体积比)充分混合后在兔子双肩周围进行皮下注射以及在后大腿进行肌肉注射;

[0058] 4、2周后第二次注射免疫、5周后的第三次免疫用不完全弗氏佐剂混合抗原;第10周收集兔的血液40mI,心脏取血,可以保证兔子继续存活,并且每隔一周取一次,取三次,总共150mI血液,可以析出约60mI;

[0059] 5、制备兔抗血清的方法参照鱼血清的制备。

[0060] 说明:目前最常用于动物实验的佐剂,它是将抗原水溶液与油剂(石蜡油或植物油)等量混合,再加乳化剂制成油包水抗原乳剂,称之为不完全弗氏佐剂;如在不完全佐剂中加入分枝杆菌(如死卡苗)则称为完全弗氏佐剂。

[0061] 五、兔抗鱼IgM血清效价的测定

[0062] ELISA测定兔抗鱼IgM血清效价

[0063] 1、包被:用抗原稀释液将抗原(含有草鱼IgM、鳙鱼IgM、鲫鱼IgM、鲤鱼IgM以及罗非鱼IgM的免疫组合物)稀释成5ug/mL,每孔加0.1mL,4℃包被过夜;

[0064] 2、洗板:次日,弃去孔内溶液,吸水纸拍干,加PBST200uL/孔,甩掉,洗5次;

[0065] 3、封闭:加入封闭液200uL/孔,37℃2h,2h后洗板,加入250uLPBST洗3次;

[0066] 4、加1抗,待检血清用血清稀释液做1:100稀释备用,100uL/孔,37℃,2h;

[0067] 5、洗板:加PBST200uL/孔,甩掉,洗5次,拍干;

[0068] 6、加入辣根过氧化物酶标二抗(羊抗兔):1:6000稀释,100uL/孔,37℃,1h;

[0069] 7、洗板:加PBST200uL/孔,5-7次,每次2min;

[0070] 8、加底物液显色:TMB提前30min复温,A液+B液(10mL)混匀,避光迅速每孔加入10uL底物溶液暗盒中15min;

[0071] 9、终止反应:加入50uL终止液,在酶标仪上与450nm测各孔OD值,若OD值大于规定的阴性对照OD值的2.1倍,即为阳性。

[0072] 如图2所示,采用含有草鱼IgM、鲫鱼IgM、大头鱼(亦即鳙鱼)IgM、鲤鱼IgM、罗非鱼IgM的免疫组合物免疫家兔三次后,第6周检测所获得的多克隆抗体血清效价,分别检测了兔抗血清对含有五种IgM免疫组合物以及单独IgM免疫抗原的效价,倍比稀释到16382400倍时兔抗鱼IgM抗血清OD值大于对照阴性血清OD值2.1倍,结果判定为阳性。说明,当免疫组合物中每种鱼IgM的含量仅为单独IgM抗原的五分之一时,免疫家兔获得的多克隆抗体的效价仍旧高达1:16382400。

[0073] 如图3所示:采用含有草鱼IgM、鲫鱼IgM、大头鱼(亦即鳙鱼)IgM、鲤鱼IgM、罗非鱼IgM的免疫组合物免疫家兔三次后,第7周检测所获得的多克隆抗体血清效价,分别检测了兔抗血清对含有五种IgM免疫组合物以及单独IgM免疫抗原的效价,倍比稀释到16382400倍时兔抗鱼IgM抗血清OD值大于对照阴性血清OD值2.1倍,结果判定为阳性。说明,当免疫组合物中每种鱼IgM的含量仅为单独IgM抗原的五分之一时,免疫家兔获得的多克隆抗体的效价仍旧高达1:16382400。

[0074] 六、兔抗鱼IgM的抗体IgG(多克隆抗体)的纯化

[0075] 1、取兔血清5mI,用平衡缓冲液PBS稀释到50mI,4℃4000r/min离心20min取上清用0.45um的过滤器处理;

[0076] 2、10倍柱体积平衡缓冲液PBS平衡柱子后上样,流速为1ml/min;

[0077] 3、为使IgG与rProteinA充分结合,将样本以1ml/min的流速反复过柱三次,并在柱床上4℃孵育2h,然后再用10倍柱体积平衡缓冲液PBS (20mmol/L PBS, pH=7.4) 洗脱未结合蛋白至A=0 (OD280nm=0), 6倍柱体积的0.1mol/L甘氨酸 (PH=2.5) 洗脱液洗脱目的蛋白, 1ml分管收集;

[0078] 4、为防止蛋白变性立刻用中和液中和,每管加65uL的Tris-HCl中和液 (pH=9.0) 以达抗体稳定的PH值, PH=8.0;

[0079] 5、收集液经SDS-PAGE检测后合并,用PBS缓冲液透析,每隔6小时换掉三分之一透析液,透析24h (目的:把盐透析出来,将抗体保存在稳定的PBS缓冲液当中),用聚乙二醇 (PEG20000) 浓缩蛋白, -80℃保存;

[0080] 6、用0.5M醋酸缓冲液3到5个柱体积,洗脱结合更牢固的蛋白,之后用10倍柱体积纯水冲洗,然后用5倍柱体积20%乙醇冲洗,并将柱子保存在20%乙醇中,放4℃保存。

[0081] 七、兔抗鱼IgM的抗体IgG的检测

[0082] (1) 蛋白浓度的测定

[0083] 纯化5ml兔抗混合5种鱼IgM的抗体,最终获得浓缩后混合兔抗3ml,混合兔抗浓度为11mg/ml,混合兔抗含量为33mg,血清中混合兔抗IgG的含量约为6.6mg/ml。

[0084] (2) SDS-PAGE检测蛋白质纯化效果

[0085] 样品与上样缓冲液 (60mmol/L的Tris-HCl, PH6.8, 25%甘油, 0.1%溴酚蓝, 2% SDS, 13-巯基乙醇14.4mmol/L) 4:1混合后,沸水中煮5min,没孔上样量10uL。浓缩电压80V,分离胶加大到120V,电泳1.5h,考马斯亮兰R-250染色1h,沸水中煮20min,观察结果。如图4所示。

[0086] 八、兔抗鱼IgM的抗体IgG (多克隆抗体) 的HRP标记

[0087] 标记步骤:

[0088] (1) 称取5mgHRP溶解于1ml双蒸水中;

[0089] (2) 于上液中加入0.2ml新配的0.1M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌20min,至溶液呈现草绿色;

[0090] (3) 将上述溶液装入透析袋中,对1mM, PH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜 (16h换液2次),至溶液呈现浅棕色;

[0091] (4) 加20μl 0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化物RP的PH升高到9.0~9.5,然后立即加入5mg IgG抗体在1ml 0.01M碳酸盐缓冲液中,室温避光轻轻搅拌2h;

[0092] (5) 加0.1ml新配的4mg/ml NaBH₄液,混匀,再置4℃2h;

[0093] (6) 在搅拌下逐渐加入等体积饱和硫酸铵,置4℃1h;

[0094] (7) 3000r/min离心30min,弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗2次,最后沉淀物溶于少量0.15M pH7.4的PBS中;

[0095] (8) 将上述溶液装入透析袋中,在0.15M pH7.4的PS缓冲液,4℃透析过夜 (换液3次),去除铵离子后 (用茌氏试剂检测),10000r/min离心30min去除沉淀,上清液即为酶结合物,加入30%~40%甘油,分装-10℃下保存。(将标记抗体的浓度调整至1mg/ml左右,分装保存);

[0096] (9) 结果判定:标记物IgG的量计算公式: IgG (mg/ml) = (OD280nm-OD403nm*3) *

0.62;ELISA方法检测HRP标记抗体的效价(阳性对照用正常兔IgG 10 μ g包被,用1:20000稀释的羊抗兔IgG-HRP(PIERCE公司)与之反应,以不包被蛋白的孔作为空白对照)。

[0097] 九、Western Blot方法检测HRP标记多克隆抗体与不同鱼类免疫球蛋白间的交叉反应

[0098] 实验方法:尾静脉取另外十一种市场常见淡水鱼(鲈鱼,太阳鱼,青竹皖,桂鱼,山斑鱼,黑鱼,黄骨鱼,边鱼,仓鱼,腊鱼,白鲢)制备血清。各取1 μ L血清电泳,转NC膜,5%脱脂牛奶(溶于TBST)封闭1h,HRP标记的兔抗鱼免疫球蛋白抗体以适当比例稀释后,与膜室温孵育2h,以TBST洗膜3次,每次10min,TBST洗10min,与底物反应后曝光。

[0099] 根据图5和图6的实验结果显示:兔抗混合5种鱼的抗体IgG(多克隆抗体)不仅可以与这五种鱼的血清发生反应,并且可以与太阳鱼血清、青竹皖血清、桂鱼血清、山斑鱼血清、黑鱼血清、边鱼血清、仓鱼血清和白鲢血清等其他8种鱼类的血清发生交叉反应。由此可以看出此多克隆抗体可以用于多达13种淡水鱼免疫应答水平的检测。

[0100] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例,上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而并非对本发明任何形式上和实质上的限制,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明方法的前提下,还将可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。凡熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,当可利用以上所揭示的技术内容而做出的些许更动、修饰与演变的等同变化,均为本发明的等效实施例;同时,凡依据本发明的实质技术对上述实施例所作的任何等同变化的更动、修饰与演变,均仍属于本发明的技术方案的范围。

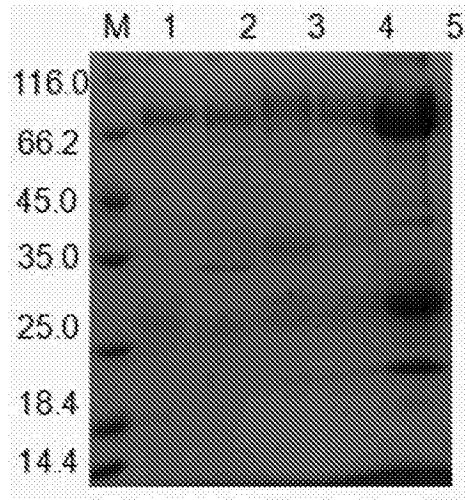


图1

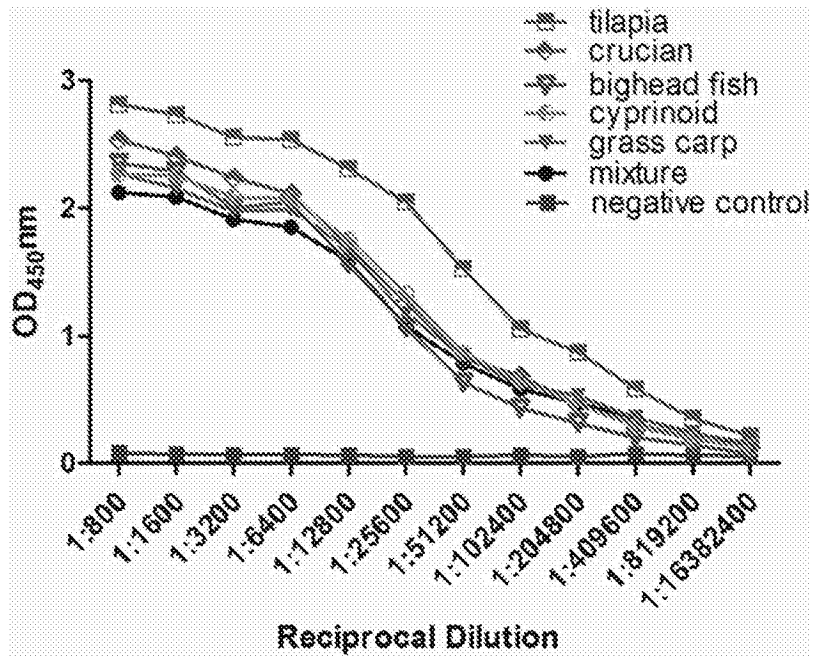


图2

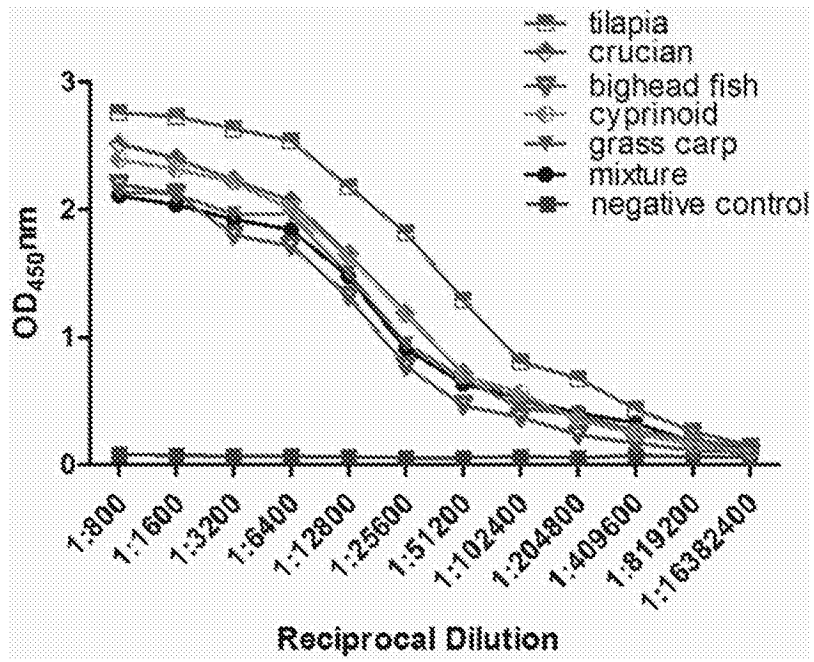


图3

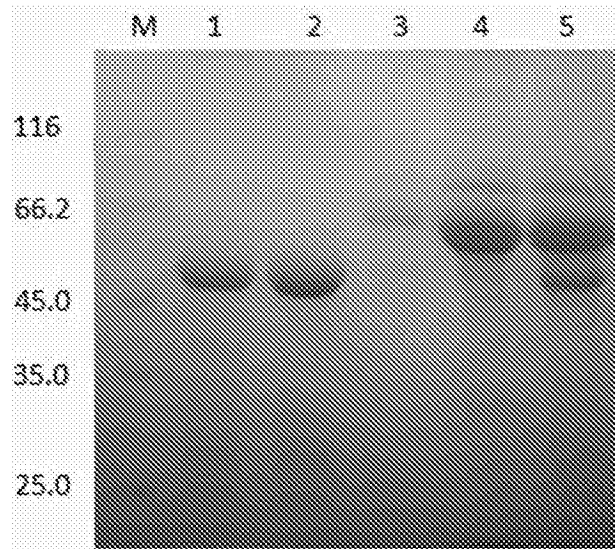


图4

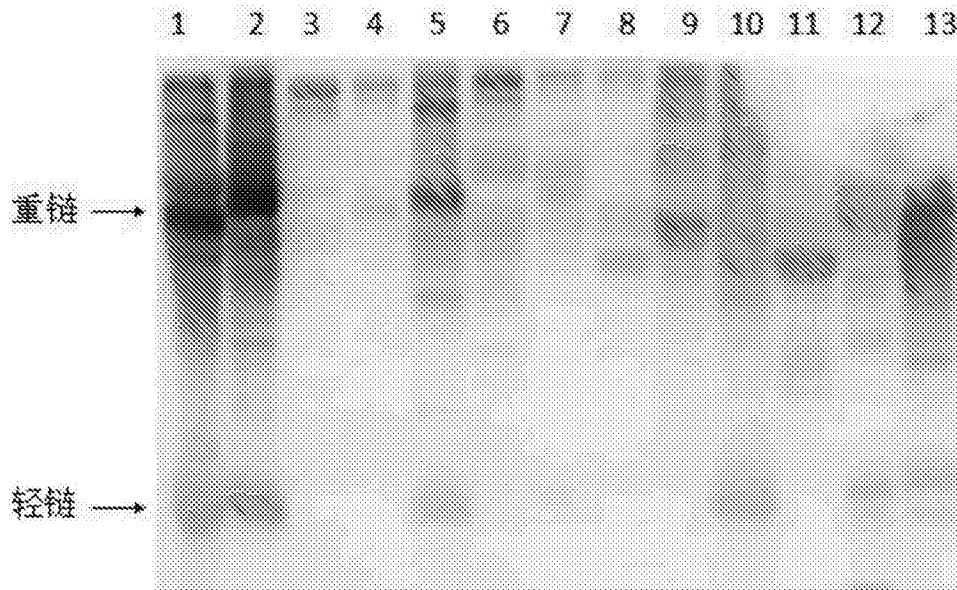


图5

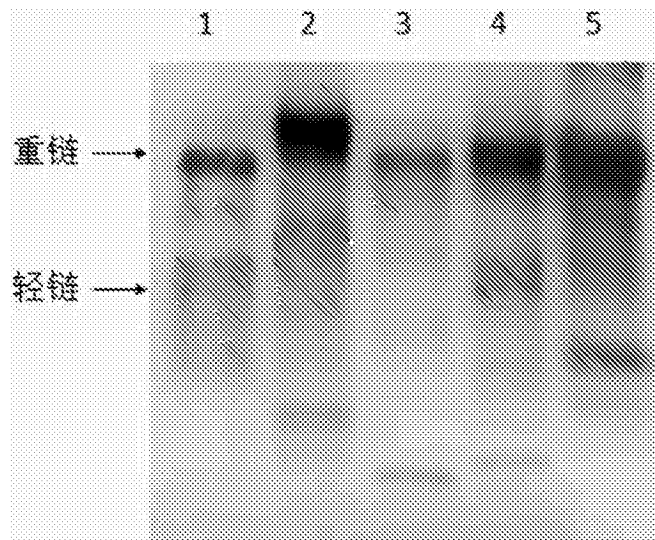


图6

专利名称(译)	通用型淡水鱼多克隆抗体及其制备与应用		
公开(公告)号	CN106565842A	公开(公告)日	2017-04-19
申请号	CN201610990857.1	申请日	2016-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学		
申请(专利权)人(译)	中山大学		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学		
[标]发明人	余新炳 周心怡 姜红焜 唐泽丽 孙恒昌 黄艳 陈庭金 林志鹏 任鹏丽		
发明人	余新炳 周心怡 姜红焜 唐泽丽 孙恒昌 黄艳 陈庭金 林志鹏 任鹏丽		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	李艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物化学及分子免疫学领域，主要涉及通用型淡水鱼多克隆抗体及其制备与应用。本发明的第一方面提供了一种免疫组合物，所述免疫组合物含有草鱼IgM、鳙鱼IgM、鲫鱼IgM、鲤鱼IgM以及罗非鱼IgM。采用本发明的免疫组合物作为免疫抗原免疫动物获得多克隆抗体，所述多克隆抗体的效价在1：1000000以上，不仅可以应用于草鱼、鲫鱼、鲤鱼、鳙鱼以及罗非鱼这五种鱼免疫应答水平的检测，还可以用于其他8种鱼免疫应答水平的检测。

鱼种	浓缩后IgM浓度 (mg/ml)	浓缩后血清体积 (ml)	IgM总量 (mg)	血清量 (ml)	IgM浓度 (mg/ml)
草鱼	0.56	5.6	3.136	40	0.078
鳙鱼	2.00	3.2	6.4	40	0.16
鲫鱼	0.68	4.2	2.856	40	0.071
鲤鱼	0.70	4.1	2.87	40	0.072
罗非鱼	0.93	4	3.72	40	0.093