



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104558173 B

(45)授权公告日 2017. 11. 10

(21)申请号 201510017441.7

(22)申请日 2015.01.13

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104558173 A

(43)申请公布日 2015.04.29

(73)专利权人 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.

C07K 16/18(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

审查员 王康

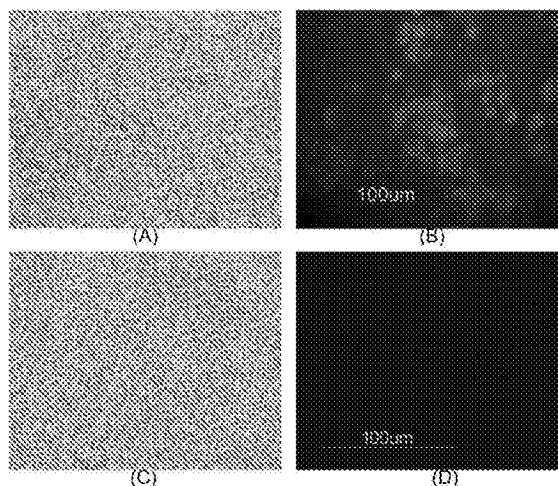
权利要求书1页 说明书7页  
序列表1页 附图3页

(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;所述多克隆抗体通过以下方法制备得到:

1) 合成多肽:以序列为SEQ ID NO:1的多肽片段为模板,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。

2. 一种根据权利要求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,其具体步骤如下:

1) 合成多肽:以序列为SEQ ID NO:1的多肽片段为模板,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。

3. 根据权利要求2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℃,1h;然后分别加入1:4000倍稀释的兔血清,4℃,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℃,1 h,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℃,过夜,3000rpm离心5分钟,收集血清。

4. 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。

## 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(MegaLocyctivirus)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℃,1h;然后分别加入1:4000倍稀释的兔血清,4℃,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℃,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℃,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),室温孵育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,孵育20-40min,再用PBST洗涤;

[0026] 6) 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为鳃脾脏组织切片的免疫荧光图;其中,A、B为感染ISKNV的鳃脾脏组织切片,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为健康鳃脾脏组织切片,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感染发病的鳃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健康鳃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为鳃脾脏组织样品Western-blotting结果图;泳道1::感染ISKNV的鳃脾脏组织;泳道2:健康鳃脾脏组织;

[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℃,1h;然后分别加入1:4000倍稀释的兔血清,4℃,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℃,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℃,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℃,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℃,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℃,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IKSNV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),100μL/孔,37℃孵育2h,300μL TBST洗涤液洗三次;每孔加入300μL封闭液(Pierce),37℃孵育1h,每孔加入100μL 3000倍稀释的兔抗ISKNV-23P8多克隆抗体,37℃孵育1.5h,300μL TBST洗涤液洗三次;每孔加入100μL 2000倍稀释的HRP-羊抗猪IgG(KPL),室温孵育45min,300μL TBST洗涤液洗三次;每孔加入100μL ELISA显色液,室温

避光孵育10min;每孔加入100 $\mu$ L 2moI/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,以终止反应,应用酶标仪读取每孔在OD<sub>450</sub>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 ( $\mu$ 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,室温孵育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)孵育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,室温孵育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),孵育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. 免疫荧光显微镜检测

[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检测;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℃,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℃,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℃,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,在湿盒中室温孵育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

要求保护的范围。

- 〈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  
 [0001] 〈211〉 14  
 〈212〉 PRT  
 〈213〉 artificial  
  
 〈400〉 1  
 Asp Gly Gly Ser Gly Met Asp Asp Tyr Asp Asp Ile Asp Glu  
  
 5 10

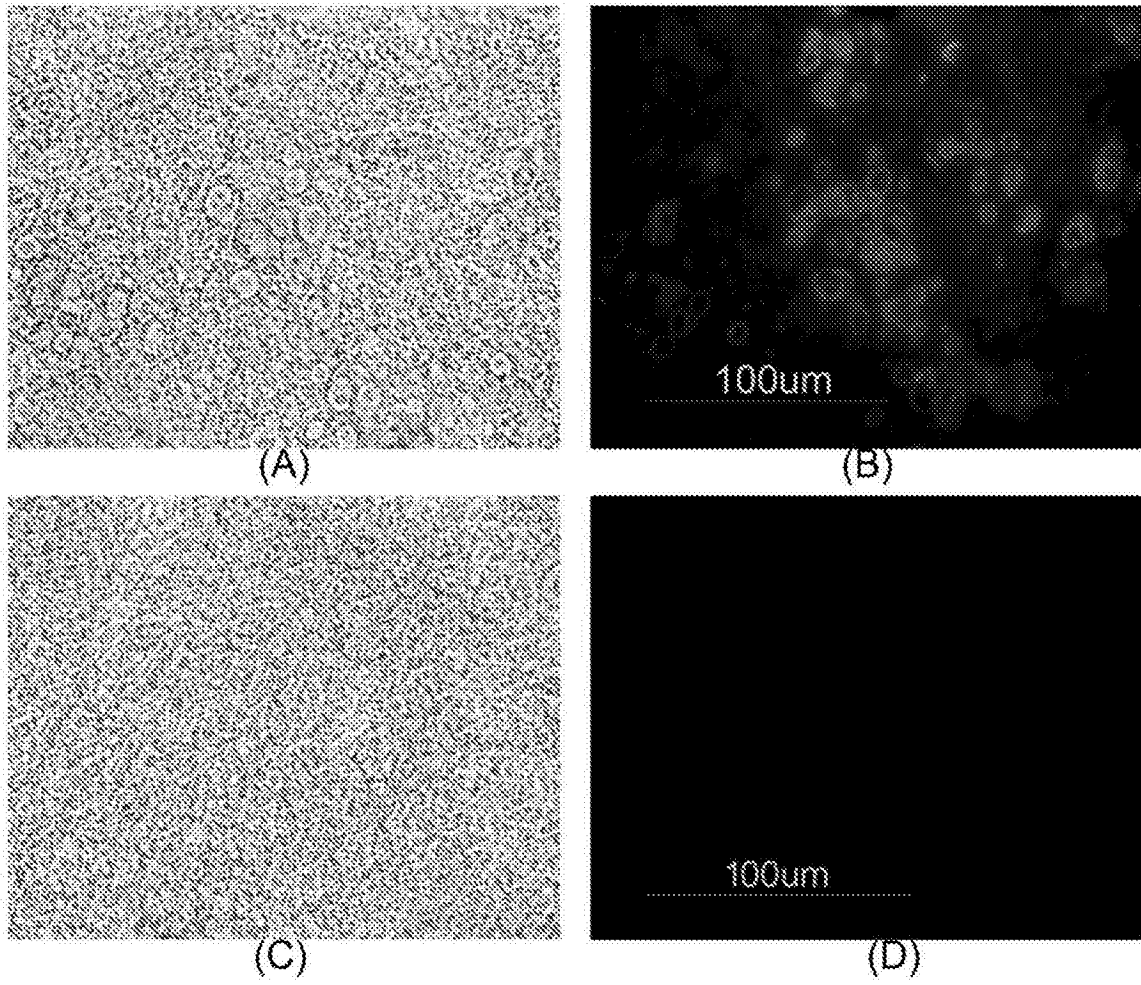


图1

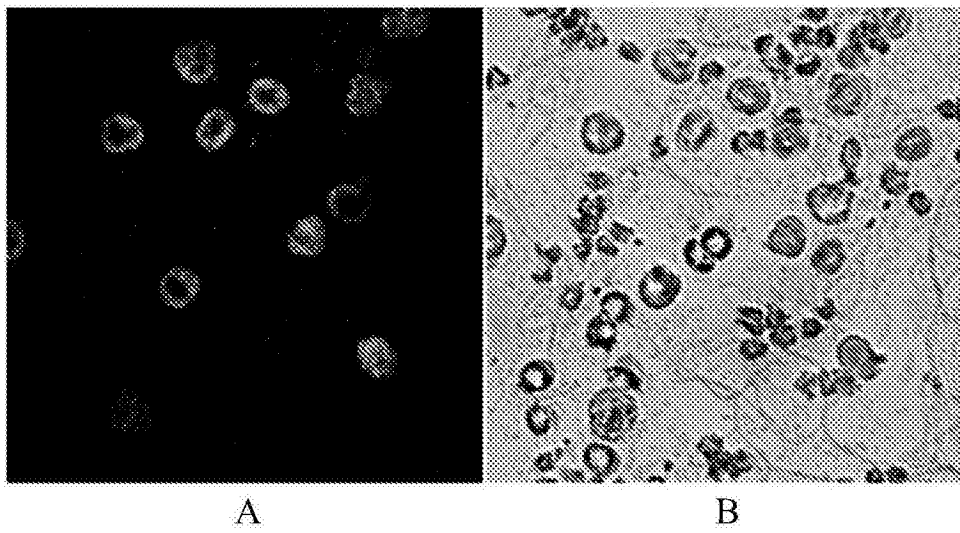


图2

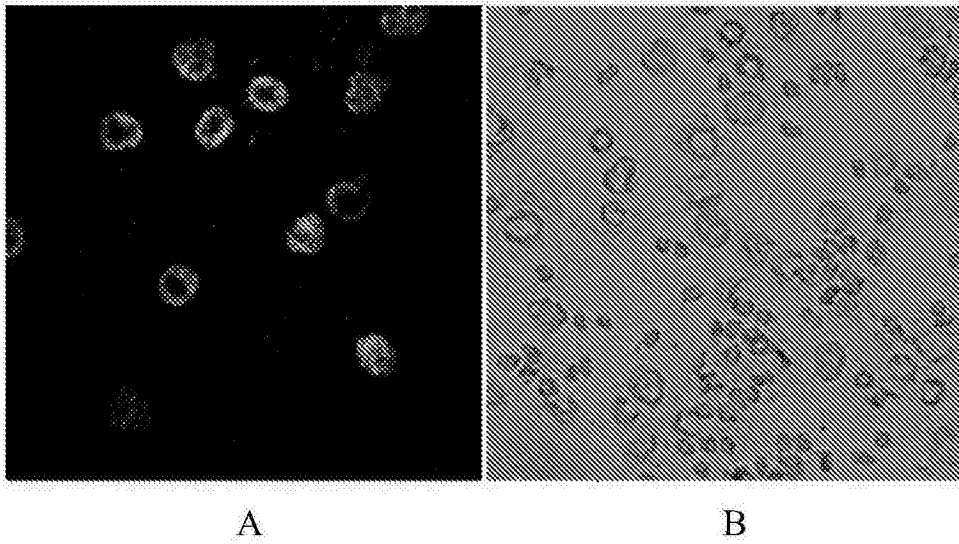


图3

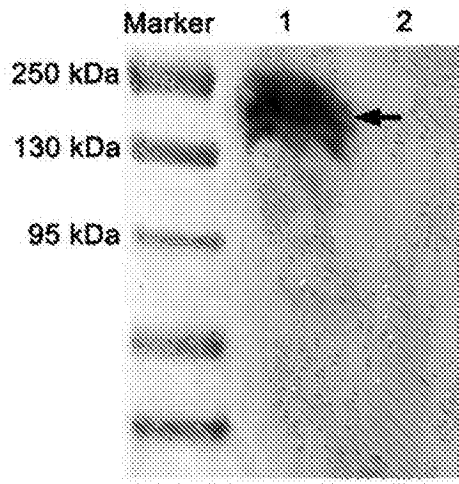


图4

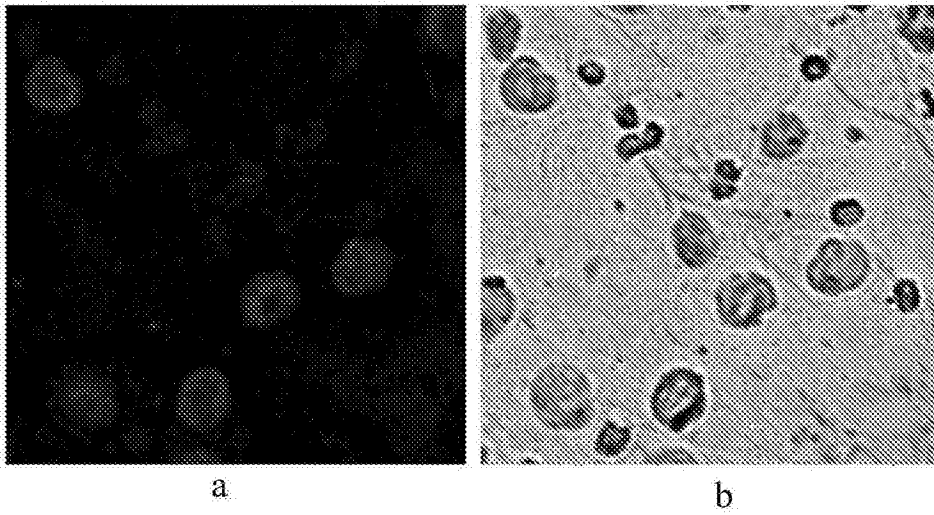


图5

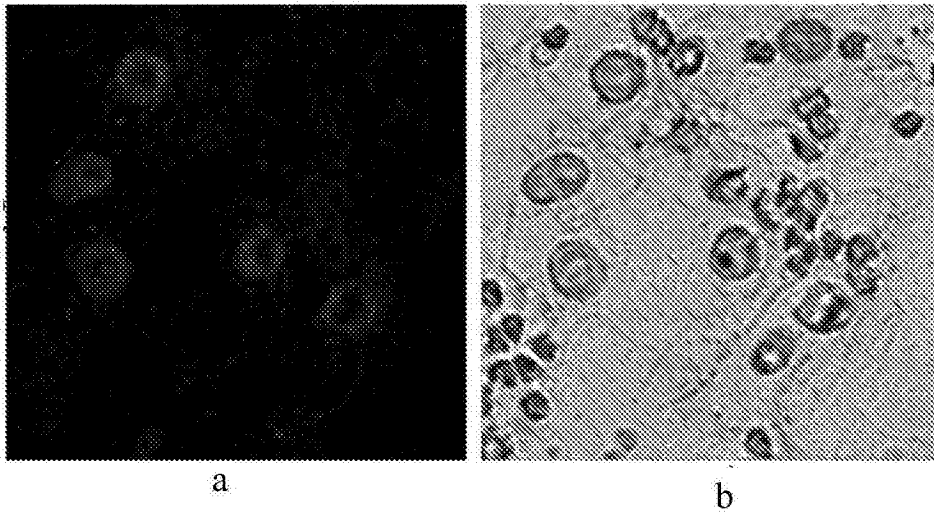


图6

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	<a href="#">CN104558173B</a>	公开(公告)日	2017-11-10
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		
审查员(译)	王康		
其他公开文献	CN104558173A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

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免抗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。

