



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107367608 A

(43)申请公布日 2017. 11. 21

(21)申请号 201710697248.1

(22)申请日 2017.08.15

(71)申请人 南京农业大学

地址 210000 江苏省南京市玄武区卫岗1号

(72)发明人 刘广锦 潘子豪 高婷婷 马家乐
姚火春

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 董建林 薛海霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

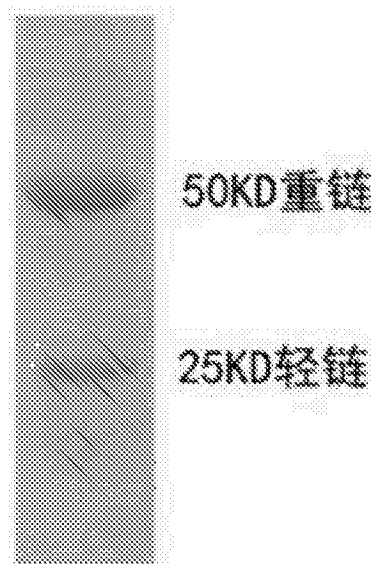
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

一种用于罗非鱼IgM检测的酶标抗体及制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于罗非鱼IgM检测的酶标抗体的制备方法,属于生物技术领域,采集罗非鱼血清,用Protein G亲和纯化得到罗非鱼IgM抗体,再将罗非鱼IgM抗体免疫新西兰大白兔,得到兔抗罗非鱼IgG抗体,通过辣根过氧化物酶对兔抗罗非鱼IgG抗体进行标记得到酶标二抗。相对于现有技术,本发明的有益效果:本发明采用亲和层析的方法,制备高浓度的兔抗罗非鱼IgM的多克隆抗体,纯化后进行辣根过氧化物酶标记和标记后抗体浓度测定,效价大于1:128000,通过适当稀释用于免疫反应中,用于检测罗非鱼IgM,有助于罗非鱼链球菌病的规模化防控。



1. 一种用于罗非鱼IgM检测的酶标抗体,其特征在于,将兔抗罗非鱼IgG抗体用辣根过氧化物酶标记,作为酶标二抗。

2. 一种如权利要求1所述的用于罗非鱼IgM检测的酶标抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:采集罗非鱼血清,用Protein G亲和纯化得到罗非鱼IgM抗体,再将罗非鱼IgM抗体免疫新西兰大白兔,得到兔抗罗非鱼IgG抗体,通过辣根过氧化物酶对兔抗罗非鱼IgG抗体进行标记。

3. 根据权利要求2所述的于罗非鱼IgM检测的酶标抗体的制备方法,其特征在于,罗非鱼IgM抗体的制备过程为:

用Protein G琼脂糖亲和介质填充层析柱,将断尾取血法所得罗非鱼血清与PBS缓冲液等量混合后缓慢上样,待抗原抗体充分结合后用甘氨酸洗脱缓冲液洗脱,即得到所需的罗非鱼IgM抗体,立即在PBS缓冲液中进行4℃透析过夜,收集透析袋内液体,得到纯化的罗非鱼IgM抗体。

4. 根据权利要求3所述的于罗非鱼IgM检测的酶标抗体的制备方法,其特征在于,兔抗罗非鱼IgG抗体的制备过程为:

将纯化的罗非鱼IgM抗体通过BCA蛋白浓度测定试剂盒测定,免疫2-2.5KG的新西兰白兔,选择背部多点注射法,皮下免疫400ug/次,每2周免疫一次,每只白兔一共免疫4次;采血检测,通过间接 ELISA 方法确定抗血清的效价,待效价大于1:50000进行最终的心脏采血、分离血清的操作。

5. 根据权利要求4所述的于罗非鱼IgM检测的酶标抗体的制备方法,其特征在于,得到兔抗罗非鱼IgG抗体后,纯化兔抗罗非鱼IgG抗体:

将罗非鱼IgM与琼脂糖介质偶联制备成抗原亲和纯化层析柱,将兔抗罗非鱼IgG抗体的制备过程得到的兔抗血清与PBS缓冲液等量混合后缓慢上样,待抗原抗体充分结合后用甘氨酸洗脱缓冲液洗脱,即得到所需纯化抗体,立即在PBS中进行4度透析过夜,收集透析袋内液体,得到纯化的兔抗罗非鱼IgG抗体,并进行纯度、浓度和效价测定,保存备用。

6. 根据权利要求5所述的于罗非鱼IgM检测的酶标抗体的制备方法,其特征在于,得到纯化的兔抗罗非鱼IgG抗体后,进行兔抗罗非鱼IgG抗体的酶标记:

称取足量辣根过氧化物酶(HRP),用双蒸水溶解,同时称取足量NaIO₄,用双蒸水溶解;每毫升HRP溶液中加入200uI NaIO₄溶液,避光反应后,加入1/10体积的乙二醇;用醋酸钠溶液4℃透析过夜,将透析后的液体取出,加入碳酸盐溶液调整pH值;按照质量比HRP:抗体=1:1的比例将抗体与HRP混合,室温避光反应,然后加入4mg/mI的硼氢化钠至终浓度50uI/mI,室温避光反应;将上述溶液置于PBS缓冲液中4℃透析过夜,期间换液两次,得到再次透析后的含标记后抗体的液体;再次透析后的液体,按10mg/mI的抗体浓度加入到PBS缓冲液,加硫柳汞至终浓度为0.01%, -20℃避光保存。

7. 根据权利要求6所述的于罗非鱼IgM检测的酶标抗体的制备方法,其特征在于,对标记后抗体进行ELISA效价检测,标记抗体的效价大于1:128000。

一种用于罗非鱼IgM检测的酶标抗体及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于罗非鱼IgM检测的酶标抗体及制备方法,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 罗非鱼(Tilapia)有“白色三文鱼”之称,具有蛋白质含量高,生长快,抗病能力强,对环境污染少等特点,是联合国推荐养殖的优质水产养殖品种。我国于1978年引入尼罗罗非鱼种鱼,1983年中国水产科学院无锡淡水渔业研究中心夏德全研究组又引入奥利亚罗非鱼种鱼,经多年的选育,逐渐育成体壮种纯的优良品系。经过三十多年的发展,我国已成为罗非鱼养殖产量最大的国家,年产量达150万吨,占全世界总产量的50%,产品常年出口美国、欧盟和俄罗斯等国家。但自2009年以来,我国罗非鱼主养区每年夏季持续爆发罗非鱼链球菌病,累计死亡率可达95%,年损失约10-15亿元,造成了巨大的经济损失,该病严重危害罗非鱼养殖产业的发展,因此对罗非鱼链球菌病的防控非常必要。

[0003] 有颌鱼类产生的抗体类型主要是IgM,高纯度罗非鱼IgM及其酶标抗体的制备是研究罗非鱼免疫应答、免疫检测方法的基础,为罗非鱼的疫病防控提供技术支持,但市场上尚无商品化的抗罗非鱼IgM的标记二抗出售。

发明内容

[0004] 本发明针对现有技术存在的上述不足,本发明的目的在于提供一种用于罗非鱼IgM检测的酶标抗体的制备方法,其采用亲和层析的方法,制备高浓度的兔抗罗非鱼IgM的多克隆抗体,纯化后进行辣根过氧化物酶标记和标记后抗体浓度测定,效价大于1:128000。

[0005] 本发明的另一个目的为提供一种用于罗非鱼IgM检测的酶标抗体。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明通过以下技术方案实现:一种用于罗非鱼IgM检测的酶标抗体,其特征在于,将兔抗罗非鱼IgG抗体用辣根过氧化物酶标记,作为酶标二抗。

[0007] 一种用于罗非鱼IgM检测的酶标抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:采集罗非鱼血清,用Protein G亲和纯化得到罗非鱼IgM抗体,再将罗非鱼IgM抗体免疫新西兰大白兔,得到兔抗罗非鱼IgG抗体,通过辣根过氧化物酶对兔抗罗非鱼IgG抗体进行标记。

[0008] 罗非鱼IgM抗体的制备过程为:用Protein G琼脂糖亲和介质填充层析柱,将断尾取血法所得罗非鱼血清与PBS缓冲液等量混合后缓慢上样,待抗原抗体充分结合后用甘氨酸洗脱缓冲液洗脱,即得到所需的罗非鱼IgM抗体,立即在PBS缓冲液中进行4℃透析过夜,收集透析袋内液体,得到纯化的罗非鱼IgM抗体。

[0009] 兔抗罗非鱼IgG抗体的制备过程为:将纯化的罗非鱼IgM抗体通过BCA蛋白浓度测定试剂盒测定,免疫2-2.5KG的新西兰白兔,选择背部多点注射法,皮下免疫400ug/次,每2周免疫一次,每只白兔一共免疫4次;采血检测,通过间接ELISA方法确定抗血清的效价,待效价大于1:50000进行最终的心脏采血、分离血清的操作。

[0010] 得到兔抗罗非鱼IgG抗体后,纯化兔抗罗非鱼IgG抗体,纯化过程为:将罗非鱼IgM与琼脂糖介质偶联制备成抗原亲和纯化层析柱,将兔抗罗非鱼IgG抗体的制备过程得到的

兔抗血清与PBS缓冲液等量混合后缓慢上样,待抗原抗体充分结合后用甘氨酸洗脱缓冲液洗脱,即得到所需纯化抗体,立即在PBS中进行4度透析过夜,收集透析袋内液体,得到纯化的兔抗罗非鱼IgG抗体,并进行纯度、浓度和效价测定,保存备用;

[0011] 得到纯化的兔抗罗非鱼IgG抗体后,进行兔抗罗非鱼IgG抗体的酶标记:称取足量辣根过氧化物酶(HRP),用双蒸水溶解,同时称取足量NaIO₄,用双蒸水溶解;每毫升HRP溶液中加入200uI NaIO₄溶液,避光反应后,加入1/10体积的乙二醇;用醋酸钠溶液4℃透析过夜,将透析后的液体取出,加入碳酸盐溶液调整pH值;按照质量比HRP:抗体=1:1的比例将抗体与HRP混合,室温避光反应,然后加入4mg/mI的硼氢化钠至终浓度50uI/mI,室温避光反应;将上述溶液置于PBS缓冲液中4℃透析过夜,期间换液两次,得到再次透析后的含标记后抗体的液体;再次透析后的液体,按10mg/mI的抗体浓度加入到PBS缓冲液,加硫柳汞至终浓度为0.01%, -20℃避光保存。

[0012] 对标记后抗体进行ELISA效价检测,标记抗体的效价大于1:128000。

[0013] 相对于现有技术,本发明的有益效果:

[0014] 本发明采用亲和层析的方法,制备高浓度的兔抗罗非鱼IgM的多克隆抗体,纯化后进行辣根过氧化物酶标记和标记后抗体浓度测定,效价大于1:128000,通过适当稀释用于免疫反应中,用于检测罗非鱼IgM,有助于罗非鱼链球菌病的规模化防控。

附图说明

[0015] 图1为罗非鱼IgM抗体纯化的SDS-PAGE图。

[0016] 图2为兔抗鱼血清IgG抗体纯化的SDS-PAGE图。

具体实施方式:

[0017] 下面通过具体实施例和附图,对本发明做进一步的说明。

[0018] 1.1Protein G纯化罗非鱼血清

[0019] 取Protein G琼脂糖亲和介质,填装层析柱,将断尾取血法所得罗非鱼血清与PBS缓冲液等量(等体积)混合后缓慢上样,待抗原抗体充分结合后用甘氨酸洗脱缓冲液洗脱,即得到所需的罗非鱼IgM抗体,立即在PBS缓冲液中进行4℃透析过夜,隔日进行纯度、浓度测定。通过SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色观察纯化抗体的纯度,如图1所示,纯化的罗非鱼IgM分别具有25kDa轻链和50kDa重链两条带。

[0020] 1.2兔抗罗非鱼IgM二抗的制备和纯化和HRP标记

[0021] 将纯化的罗非鱼IgM抗体通过BCA蛋白浓度测定试剂盒测定,免疫2只新西兰白兔(2-2.5KG),皮下免疫400ug/次,2-3周免疫一次,免疫4次。采血检测,通过间接ELISA方法确定抗血清的效价,待效价大于1:50,000进行最终采血,分离抗血清,并准备纯化。

[0022] 将罗非鱼IgM与琼脂糖介质偶联制备成抗原亲和纯化层析柱,将所得兔抗血清与PBS等量混合后缓慢上样,待抗原抗体充分结合后用甘氨酸洗脱缓冲液洗脱,即得到所需纯化抗体,立即在PBS缓冲液中进行4度透析过夜,并进行纯度、浓度和效价测定。通过SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色观察纯化抗体的纯度,如图2所示,ELISA测定纯化抗体的效价大于1:512000(表1)。

[0023] 表1兔抗罗非鱼IgG抗体的效价测定

	Dilution	A450nm	
		抗罗非鱼 IgG 纯化抗体	
[0024]	1	500	2.067
	2	1,000	2.048
	3	2,000	2.030
	4	4,000	1.839
	5	8,000	1.792
	6	16,000	1.657
	7	32,000	1.592
	8	64,000	1.573
	9	128,000	1.538
	10	256,000	1.384
	11	512,000	0.939
	12	空白	0.101
	Titer:		>512,000

[0025] 起始稀释度:1:500;

[0026] 效价即样品OD/空白OD \geq 2.1的最高稀释度。

[0027] 1.3兔抗罗非鱼IgM二抗的HRP标记

[0028] 称取足量辣根过氧化物酶 (HRP), 用双蒸水溶解, 同时称取足量NaIO₄, 用双蒸水溶解; 每毫升HRP溶液中加入200uI NaIO₄溶液, 避光反应后, 加入1/10体积 (避光反应后形成的溶液体积的1/10) 的乙二醇。用200倍以上 (上一步骤形成溶液体积的200倍以上) 体积1mM醋酸钠溶液4℃透析过夜, 将透析后的液体取出, 加入碳酸盐溶液 (0.5M, pH 9.5) 调整pH值。按照质量比HRP: 抗体=1:1的比例将抗体与HRP混合, 室温避光反应, 然后加入4mg/ml的硼氢化钠至终浓度50uI/ml, 室温避光反应。将上述溶液置于PBS (PH7.4) 缓冲液中4℃透析过夜, 期间换液两次。按10mg/ml的HRP标记的抗体浓度 (该浓度为标记后抗体在PBS溶液中的终浓度) 加入到PBS (PH7.4) 缓冲液, 加10%硫柳汞至终浓度为0.01% (其为硫柳汞占整个溶液的质量百分比), -20℃避光保存。对标记后抗体进行ELISA效价检测, 具体数据如表2, 标记抗体的效价大于1:128000。

[0029] 表2HRP标记的兔抗鱼IgG抗体的效价测定

	Dilution	A450nm	
		抗罗非鱼 IgG HRP 标记抗体	
[0030]	1	500	2.971
	2	1000	2.670
	3	2000	2.478
	4	4000	2.185
	5	8000	1.713
	6	16,000	1.137
	7	32,000	0.670
	8	64,000	0.411
	9	128,000	0.254
	10	256,000	0.184
	11	512,000	0.135
	12	空白	0.099
	Titer:		>1:128,000

[0031] 起始稀释度:1:500;

[0032] 效价即样品OD/空白OD \geq 2.1的最高稀释度。

[0033] 需要说明的是, 上述实施例不以任何形式限制本发明, 凡采用等同替换或等效变换的方式所获得的技术方案, 均落在本发明的保护范围内。

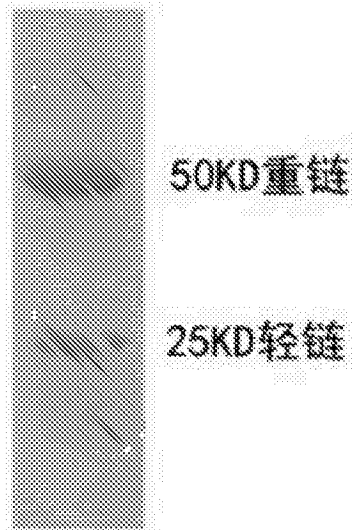


图1

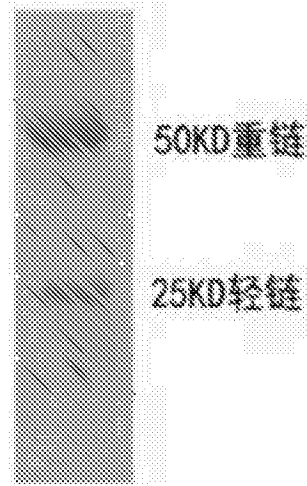


图2

专利名称(译)	一种用于罗非鱼IgM检测的酶标抗体及制备方法		
公开(公告)号	CN107367608A	公开(公告)日	2017-11-21
申请号	CN2017110697248.1	申请日	2017-08-15
[标]申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
[标]发明人	刘广锦 潘子豪 高婷婷 马家乐 姚火春		
发明人	刘广锦 潘子豪 高婷婷 马家乐 姚火春		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	董建林 薛海霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于罗非鱼IgM检测的酶标抗体的制备方法，属于生物技术领域，采集罗非鱼血清，用Protein G亲和纯化得到罗非鱼IgM抗体，再将罗非鱼IgM抗体免疫新西兰大白兔，得到兔抗罗非鱼IgG抗体，通过辣根过氧化物酶对兔抗罗非鱼IgG抗体进行标记得到酶标二抗。相对于现有技术，本发明的有益效果：本发明采用亲和层析的方法，制备高浓度的兔抗罗非鱼IgM的多克隆抗体，纯化后进行辣根过氧化物酶标记和标记后抗体浓度测定，效价大于1：128000，通过适当稀释用于免疫反应中，用于检测罗非鱼IgM，有助于罗非鱼链球菌病的规模化防控。



50KD重链

25KD轻链