



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108373503 B

(45) 授权公告日 2021. 10. 29

(21) 申请号 201810034527.4

(22) 申请日 2018.01.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108373503 A

(43) 申请公布日 2018.08.07

(83) 生物保藏信息
GDMCC No:60225 2017.08.31

(73) 专利权人 广东省农业科学院动物科学研究所
地址 510000 广东省广州市天河区大丰一
街一号动物科学研究所

(72) 发明人 王劼 甘师仪 舒鼎铭 瞿浩
罗成龙

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

代理人 肖宇扬 付静

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)

审查员 夏颖

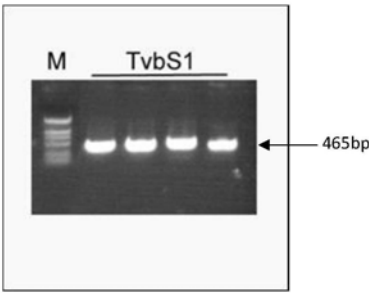
权利要求书2页 说明书6页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

一种抗鸡CAR1蛋白的多克隆抗体及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体及其制备方法,包括鸡tvb基因的提取、克隆、原核表达及免疫。禽白血病作为由禽白血病病毒(ALV)引起的一类导致禽类产生肿瘤的主要疫病之一,每年给世界家禽产业造成了巨大损失。其中禽白血病病毒(ALV)的B亚型禽白血病病毒的受体蛋白为死亡受体CAR1蛋白,目前市面上只有针对人CAR1蛋白的DR4和DR5抗体,由于种属差异性此类抗体对鸡的CAR1蛋白不具有特异性,不能准确识别鸡CAR1蛋白。本发明通过对鸡tvb基因的提取、克隆和原核表达,有效制备大量的重组蛋白GST-TvbS1,进而利用其作为抗原制备抗鸡CAR1蛋白的多克隆抗体,使多克隆抗体对鸡CAR1蛋白具有高度特异性。



1. 一种抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体,其特征在于,所述多克隆抗体由经重组质粒pGEX-4T-2-TvbS1编码表达的重组蛋白GST-TvbS1经生物免疫制得,所述重组质粒pGEX-4T-2-TvbS1的编码基因序列为序列表中SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列;

制备方法包括以下步骤:步骤一:提取鸡tvb基因;

步骤二:构建原核表达载体重组蛋白GST-TvbS1;

步骤三:使用重组蛋白GST-TvbS1对大肠杆菌细胞进行感受态转化,制备工程菌;步骤四:诱导工程菌进行重组蛋白GST-TvbS1的表达,并进行纯化;

步骤五:使用重组蛋白GST-TvbS1或包括重组蛋白GST-TvbS1的组合物对哺乳动物进行免疫,制备多克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的多克隆抗体,其特征在于,所述重组蛋白GST-TvbS1由保藏号为GDMCC60225的大肠杆菌菌株BL21制备而成。

3. 根据权利要求1所述的多克隆抗体,其特征在于,所述步骤一中提取鸡tvb基因的方法如下:

从7~9日龄鸡胚中分离胚胎成纤维细胞,使用Trizol抽提纤维细胞的RNA,使用1%琼脂糖凝胶电泳对RNA进行分离纯化,得到可用于表达鸡CAR1蛋白的RNA;对所得RNA进行反转录,得到具有鸡tvb基因的cDNA,所述具有鸡tvb基因的cDNA序列为SEQ ID NO.1。

4. 根据权利要求1所述的多克隆抗体,其特征在于,所述步骤二中构建原核表达载体重组蛋白GST-TvbS1的方法如下:

步骤一:采用RT-PCR方法,使用引物对鸡tvb基因片段进行克隆扩增,并采用电泳的方法对扩增的鸡tvb基因片段进行回收纯化,所述鸡tvb基因片段的序列为SEQ ID NO.2;

步骤二:取步骤一所得鸡tvb基因片段,在25~40℃的条件下用BamHI和xhoI分别对回收的基因片段进行双酶切、电泳、目标片段的回收、纯化;

步骤三:在25~40℃的条件下用BamHI和xhoI分别对空的pGEX-4T-2质粒进行双酶切、电泳、目标片段的回收、纯化;

步骤四:取步骤二所得片段与步骤三所得片段按照重量比7:1混合,加入T4连接酶,并在20~30℃的条件下反应1~2小时,得到连接产物;取全部连接产物转化Ecoli.DH5α感受态,并涂布于含100mg/ml氨苄青霉素的LB或LA平板上,在25~37℃下倒置培养过夜,选取单克隆菌落,置于500μl的含100mg/ml氨苄青霉素的LB或LA液体培养基中培养3小时,提取质粒,得到重组质粒pGEX-4T-2-TvbS1。

5. 根据权利要求4所述的多克隆抗体,其特征在于,所述引物为特异性引物,所述特异性引物包括上游引物和下游引物,所述上游引物的核苷酸序列为CATGGGATCCATGCGCTCAGCTGCGCTC (SEQ ID NO.3),所述下游引物的核苷酸序列为CATGCTCGAGAGTGGAGGAGCTGGAGGA (SEQ ID NO.4)。

6. 根据权利要求1所述的多克隆抗体,其特征在于,所述步骤三制备工程菌的方法如下:

取1μl重组质粒pGEX-4T-2-TvbS1对Ecoli.BL21的感受态转化,构建带有重组质粒的工程菌pGEX-4T-2-TvbS1。

7. 根据权利要求1所述的多克隆抗体,其特征在于,所述步骤四中重组蛋白GST-TvbS1的表达及纯化方法如下:

将工程菌进行扩大培养,至其OD600值达到0.4~0.6时,加入IPTG于体系中,使体系中的IPTG浓度为0.3~0.6mM,在20~40℃的条件下诱导菌体2小时,收集菌体,过柱纯化得到包涵体,包涵体经变复性,得到重组蛋白GST-TvbS1。

8. 根据权利要求1所述的多克隆抗体,其特征在于,所述步骤五中制备多克隆抗体的方法如下:

对重组蛋白GST-TvbS1进行蛋白浓度测定,并取2~5只新西兰兔进行皮下免疫,2~3周免疫一次,每次重组蛋白GST-TvbS1的免疫量为400μg,免疫4~6次;提取兔血制备抗血清,得到抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体。

9. 一种如权利要求1所述多克隆抗体的特异性检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一:取5μg/ml的GST-TvbS1重组蛋白液作为包被抗原,按照80~100μl/孔对ELISA板进行包被;使用pH为7.4的PBS作为缓冲液对ELISA板进行包被;

步骤二:向步骤一所得ELISA板中加入抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体,每孔加入抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体20~100μl,并在25~40℃下培育2h,弃去溶液,使用浓度为0.02mol/L的PBS溶液对ELISA板洗涤3次后,每孔加入羊抗兔-HRP 100μl,在25~40℃下培育1h后,加入100μl TMB显色液反应显色10~25min,然后在使用450nm波长的ELISA读板机进行读数,通过读数确定抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体的特异性。

一种抗鸡CAR1蛋白的多克隆抗体及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗CAR1蛋白多克隆抗体,特别是涉及一种抗鸡CAR1蛋白的多克隆抗体及其制备方法。

背景技术

[0002] 禽白血病作为由禽白血病病毒(ALV)引起的一类导致禽类产生肿瘤的主要疫病之一,每年给世界家禽产业造成了巨大损失。根据病毒囊膜糖蛋白的抗原结构、病毒宿主范围及在细胞培养上不同毒株之间的相互干扰作用的不同,将ALV分为A~J 10个亚型,其中A、B、C、D、E 和J6个亚型存在于鸡中,而A亚型禽白血病病毒、B亚型禽白血病病毒和J亚型禽白血病病毒的感染最为常见。ALV通过与宿主特异性受体的结合及融合感染细胞致病。ALV受体蛋白的突变与ALV感染敏感性紧密相关,解析ALV受体蛋白有利于研发ALV抗病育种方法。B亚型禽白血病病毒的受体蛋白为死亡受体CAR1蛋白,由鸡tvb基因编码表达而成。虽然市面上有针对人CAR1蛋白的DR4和DR5抗体,由于种属差异性此类抗体对鸡的CAR1蛋白不具有特异性,不能准确识别鸡CAR1蛋白。由于目前尚未出现针对鸡CAR1蛋白具有高特异性的抗体,考虑通过基因克隆和表达来获取重组蛋白,制备具有高特异性的抗鸡CAR1蛋白抗体,用于准确识别、捕获或封闭B亚型受体蛋白,有利于深入研究该受体蛋白和ALV抗病育种方法。

发明内容

[0003] 本发明提供了一种抗鸡CAR1蛋白的多克隆抗体及其制备方法,以解决现有技术中针对鸡 CAR1蛋白缺少高度特异性抗体的问题。

[0004] 本发明目地在于提供一种抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体,所述多克隆抗体由经重组质粒 pGEX-4T-2-TvbS1编码表达的重组蛋白GST-TvbS1经生物免疫制得,所述重组质粒 pGEX-4T-2-TvbS1的编码基因序列包括序列表中SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列。

[0005] 进一步地,所述重组蛋白GST-TvbS1由保藏号为GDMCC60225的大肠杆菌菌株BL21制备而成。

[0006] 本发明的另一目地在于提供一种上述抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0007] 步骤一:提取鸡tvb基因;

[0008] 步骤二:构建原核表达载体重组蛋白GST-TvbS1;

[0009] 步骤三:使用重组蛋白GST-TvbS1对大肠杆菌细胞进行感受态转化,制备工程菌;

[0010] 步骤四:诱导工程菌进行重组蛋白GST-TvbS1的表达,并进行纯化;

[0011] 步骤五:使用重组蛋白GST-TvbS1或包括重组蛋白GST-TvbS1的组合物对哺乳动物进行免疫,制备多克隆抗体。

[0012] 进一步地,所述步骤一中提取鸡tvb基因的方法如下:

[0013] 从7~9日龄鸡胚中分离胚胎成纤维细胞,使用Trizol抽提纤维细胞的RNA,使用1%琼脂糖凝胶电泳对RNA进行分离纯化,得到可用于表达鸡CAR1蛋白的RNA;对所得RNA进

行反转录,得到具有鸡tvb基因的cDNA,所述具有鸡tvb基因的cDNA序列为SEQ ID NO.1。

[0014] 更进一步地,所述步骤二中构建原核表达载体重组蛋白GST-TvbS1的方法如下:

[0015] 步骤一:采用RT-PCR方法,使用引物对cDNA序列中的鸡tvb基因片段进行克隆扩增,并采用电泳的方法对扩增的鸡tvb基因片段进行回收纯化,所述鸡tvb基因片段的序列为SEQ ID NO.2;

[0016] 步骤二:取步骤一所得鸡tvb基因片段,在25~40℃的条件下用BamHI和xhoI分别对回收的基因片段进行双酶切、电泳、目标片段的回收纯化;

[0017] 步骤三:在25~40℃的条件下用BamHI和xhoI分别对空的pGEX-4T-2质粒进行双酶切、电泳、目标片段的回收纯化;

[0018] 步骤四:取步骤二所得片段与步骤三所得片段按照重量比7:1混合,加入T4连接酶,并在20~30℃的条件下反应1~2小时,得到连接产物;取全部连接产物转化Ecoli.DH5 α 感受态,涂布于含100mg/ml氨苄青霉素的LB或LA平板上,在25~37℃下倒置培养过夜,选取单克隆菌落,置于500 μ l含100mg/ml氨苄青霉素的LB或LA液体培养基中培养3小时,提取质粒,得到重组质粒pGEX-4T-2-tvbS1。

[0019] 更进一步地,所述引物为特异性引物,所述特异性引物包括上游引物和下游引物,所述上游引物的核苷酸序列为CATGGGATCCATGCGCTCAGCTGCGCTC (SEQ ID NO.3),所述下游引物的核苷酸序列为CATGCTCGAGAGTGGAGGAGCTGGAGGA (SEQ ID NO.4)。

[0020] 进一步地,所述步骤三中制备工程菌的方法如下:

[0021] 取1 μ l重组质粒pGEX-4T-2-TvbS1对Ecoli.BL21的感受态转化,构建带有重组质粒的工程菌pGEX-4T-2-TvbS1。

[0022] 进一步地,步骤四中重组蛋白GST-TvbS1的表达及纯化方法如下:

[0023] 将工程菌进行扩大培养,至其OD600值达到0.4~0.6时,加入IPTG于体系中,使体系中的IPTG浓度为0.3~0.6mM,在20~40℃的条件下诱导菌体2小时,收集菌体,过柱纯化得到包涵体,包涵体经变复性,得到重组蛋白GST-TvbS1。

[0024] 进一步地,所述步骤五中制备多克隆抗体的方法如下:

[0025] 对重组蛋白GST-TvbS1进行蛋白浓度测定,并取2~5只新西兰兔进行皮下免疫,2~3周免疫一次,每次重组蛋白GST-TvbS1的免疫量为400 μ g,免疫4~6次;提取兔血制备抗血清,得到抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体。

[0026] 本发明的另一目地在于提供一种上述多克隆抗体的特异性检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0027] 步骤一:取5 μ g/ml的GST-TvbS1重组蛋白液作为包被抗原,按照80~100 μ l/孔对ELISA板进行包被;使用pH为7.4的PBS作为缓冲液对ELISA板进行包被;

[0028] 步骤二:向步骤一所得ELISA板中加入抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体,每孔加入抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体20~100 μ l,并在25~40℃下培育2h,弃去溶液,使用浓度为0.02mol/L的PBS溶液对ELISA板洗涤3次后,每孔加入羊抗兔-HRP 100 μ l,在25~40℃下培育1h后,加入100 μ l TMB显色液反应显色10~25min,然后在使用450nm波长的ELISA读板机进行读数,通过读数确定抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体的特异性。

[0029] 本发明相对于现有技术,通过对鸡tvb基因的提取、克隆和原核表达,有效制备大量的重组质粒pGEX-4T-2-TvbS1,进而制备重组蛋白GST-TvbS1,利用重组蛋白GST-TvbS1作

为抗原进行抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体的制备,使所得多克隆抗体对重组蛋白GST-TvbS1具有高度特异性,进而解决现有技术中针对鸡的CAR1蛋白缺少高特异性抗体的问题,提高对鸡CAR1蛋白的研究效果。

附图说明

- [0030] 图1为鸡tvb抗原结合位点PCR产物1%琼脂糖凝胶电泳鉴定结果图;
[0031] 图2为重组质粒pGEX-4T-2-TvbS1工程菌1%琼脂糖凝胶电泳鉴定结果图;
[0032] 图3为重组质粒pGEX-4T-2-TvbS1原核表达SDS-PAGE鉴定结果图。

具体实施方式

[0033] 为了使本技术领域的人员更好地理解本发明方案,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分的实施例,而不是全部的实施例。

[0034] 保藏号为GDMCC60225大肠杆菌菌株BL21的具体保藏信息如下:

[0035] 保藏中心为广东省微生物菌种保藏中心;

[0036] 保藏编号为GDMCC NO:60225;

[0037] 生物材料名称为Escherichia coli BL21 (pGEX-4T-2-TvbS1);

[0038] 保藏日期为2017年8月31日;

[0039] 保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼

[0040] 经保藏中心于2017年9月4日检测,该生物材料为存活状态。

[0041] 本发明实施例一的抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体制备过程中所用重组质粒pGEX-4T-2-TvbS1 的制备方法如下:

[0042] 步骤一、具有鸡tvb基因的cDNA制备:

[0043] 从9日龄鸡胚中分离胚胎成纤维细胞,用传统Trizol的方法抽提CEF的总RNA,使用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量,并用微量分光光度计检测RNA纯度和浓度;按照TAKARA反转录试剂盒的说明书对RNA进行反转录得到cDNA。

[0044] 步骤二、重组质粒pGEX-4T-2-TvbS1的制备:

[0045] 以9日龄鸡胚胎成纤维细胞的cDNA为模板,利用序列分别为SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4 的特异性引物进行PCR目的片段扩增;其中,PCR反应体系为:2xPCRBuffer 25 μ l,dNTP 10 μ l,上游引物1.5 μ l,下游引物1.5 μ l,KOD酶1 μ l,cDNA 1 μ l,ddH₂O 10 μ l,total 50 μ l;扩增条件为:98 $^{\circ}$ C 2min;95 $^{\circ}$ C 10s,56 $^{\circ}$ C,72 $^{\circ}$ C 1min,36cycles;72 $^{\circ}$ C 10min;如图1所示,所得PCR 反应产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测,目标基因片段有明显扩增。使用Axygen胶回收经试剂盒纯化后的目标片段;在37 $^{\circ}$ C的条件下用BamHI和xhoI分别对回收产物和空的pGEX-4T-2质粒进行双酶切、电泳、目的片段的回收纯化,二者在7:1的比例下用T4连接酶于22 $^{\circ}$ C反应1小时,取全部连接产物对Ecoli.DH5 α 的感受态进行转化,涂布100mg/ml的氨苄青霉素的LB平板,在37 $^{\circ}$ C下倒置培养过夜,挑选阳性克隆进行测序,将测序正确的阳性克隆进行扩大培养;用Axygen 小量质粒抽提试剂盒来抽提质粒,得到重组后的原核表达质粒pGEX-4T-2-TvbS1,所得质粒进行电泳鉴定,结果如图2所示。

[0046] 其中,SEQ ID NO.1序列为:

[0047] ATGCGCTCAGCTGCGCTCCGGTTGTGCCCCGTTCTACTGCTGCTCTTCGCGGAGGTTTCAGTT GGGAT CTGCTGCAGCAGTGAAGAAGAGGGCAGACAGGTCAGACCTCCAGAAGCCAGACC TCTACAGAAGGAAGTGTCTTA TGGGCACCTATGAGGCAAATGACTCCATCCAGTGCCTCCCA TGTAAGAAAGACGAGTACACCGAGTATCCAAATG ACTTTCCCAAGTGCCTGGGCTGCCGGA CGTGTAGGGAAGACCAGGTGGAGGTGAGTCCCTGCATCCCCACCAGGA ACACGCAGTGC G CTTGCAAGAACGGCACCTTCTGCTTACCTGACCACCCCTGTGAGATGTGCCAAAAGTGCCA G ACCGAGTGCCCCAAAGGACAAGTGAGGTTAGCTCCGTGCACGCAACACAGCGACCTGCT GTGCGGTCCACCCTTG GAAATCTCTCCAGCTCCTCCACTTTATGGATCATCATCACCTTCAC CGTGCTGCTGGCTGTGATCCTGGGGCTC GTGCTGGTGTCTTCTGGAAGAGGTGCTCCTCCAGA CACCACGGTGCAGGGGATGATGGAGAGCTGAGCTGGAAGCCC AGCGCCGTGGTGAACAGA CTGTTGCAGCGGCTGGGGATTTCAGGACAACAGATGCAATGAGCAGATCTACCAGAAC CAG CAGCAGCAGGAGCTGCTTTTCACAGCGCAGGGCTCAGAGGTTCCCCATGGTGTGGAGATG GAGGGGACGGA ACGAAGAACCCAGATCCCAAAGTGGAACCCAGAGGAAGCTGGTTCC AGTGCTAGGAGAGAACCCCATAGCCCT TTTGCATCGCTCTTTCAACACCTTTGTGCGACTATG TGCCCTTCCCGGAATGGAAGAGATTTGGCCGAGCCCTCGA CCTGCAGGAAAACGACCTTTA TCTGGCAGAGCAGCAGACAGGGTCTCATGTGAGCCGTTCTATCAGATGCTCAA CACGTGG CTCAACCAACAGGGCAGCAAAGCCTCTGTGAATACGCTGCTGGAGACCCTGCCCCGCATCG GCCTCA GCGGCGTGGCAGACATAATTGCATCCGAACCTATTAGCAAGGGCTATTTCCAGTAC GAGGTGAGCTGA;

[0048] SEQ ID NO.2序列为:

[0049] ATGCGCTCAGCTGCGCTCCGGTTGTGCCCCGTTCTACTGCTGCTCTTCGCGGAGGTTTCAGTT GGGAT CTGCTGCAGCAGTGAAGAAGAGGGCAGACAGGTCAGACCTCCAGAAGCCAGACC TCTACAGAAGGAAGTGTCTTA TGGGCACCTATGAGGCAAATGACTCCATCCAGTGCCTCCCA TGTAAGAAAGACGAGTACACCGAGTATCCAAATG ACTTTCCCAAGTGCCTGGGCTGCCGGA CGTGTAGGGAAGACCAGGTGGAGGTGAGTCCCTGCATCCCCACCAGGA ACACGCAGCGCG CTTGCAAGAACGGCACCTTCTGCTTACCTGACCACCCCTGTGAGATGTGCCAAAAGTGCCA G ACCGAGTGCCCCAAAGGACAAGTGAGGTTAGCTCCGTGCACGCAACACAGCGACCTGCT GTGCGGTCCACCCTTG GAAATCTCTCCAGCTCCTCCACT。

[0050] 实施例一

[0051] 本发明实施例一抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体的制备方法如下:

[0052] 步骤一、重组质粒的原核表达:

[0053] 将重组质粒转化至Ecoli.BL21感受态细胞中,并将细胞涂布于具有100mg/ml氨苄青霉素的LB平板上,在37℃的条件下倒置培养过夜,筛选到的阳性克隆即为含有重组质粒的工程菌;将该单克隆工程菌在含100mg/ml氨苄青霉素的LB液体培养基中扩大培养后,用甘油保存菌种;将保存的工程菌按1:500接种到5ml LA液体培养基中,在37℃下培养过夜,进行活化;取活化后的工程菌按1:100的比例接种至新鲜的LB液体培养基(含100mg/l氨苄青霉素)中,在37℃下培养约4小时,至OD600值为0.6左右;加入IPTG至体系中IPTG的浓度为0.6mM,在37℃下诱导pGEX-4T-2-TvbS1工程菌进行表达,诱导2h后收集菌体,处理后的菌体蛋白样品进行12% SDS-PAGE电泳检测,检测结果如图3所示;

[0054] 步骤二、重组蛋白GST-TvbS1的纯化:

[0055] 取GST融合蛋白纯化试剂盒对重组蛋白GST-TvbS1进行纯化,具体纯化步骤如下:

[0056] 取步骤一所得菌液2L在15℃下诱导培养12h,收集细胞,使用2x35ml冰浴的BufferA (20mM Tris-HCl,300mM NaCl,1%Triton-100,pH8.0)重悬,并采用超声裂解细胞,对所得溶液进行离心,取离心后的上清液进行GST柱层析,依次使用100ml Buffer E

(20mM Tris-HCl pH8.0, 2M NaCl, 1% TritonX-100)、30ml Buffer F (20mM Tris-HCl pH8.0, 50mM NaCl, 0.1% TritonX-100)、Buffer G (20mM Tris-HCl pH8.0, 50mM NaCl, 10mM GSH) 洗涤GST柱, 收集洗涤液中沉淀, 80%以上的重组蛋白GST-TvbS1以包涵体形式存在于沉淀中。

[0057] 步骤三、重组蛋白GST-TvbS1的提取:

[0058] 对步骤二所得沉淀用35ml包涵体洗涤液B (50mM Tris, 500mM NaCl, 1% TritonX-100, 10%甘油) 进行超声洗涤, 重复此操作3次后, 用35ml包涵体洗涤液C (50mM Tris, 500mM NaCl, 1% TritonX-100, 10%甘油, 2M尿素) 进行超声洗涤1次; 取15ml包涵体溶解液 (50mM Tris, 50mM NaCl, 0.1% TritonX-100, 8M尿素) 对包涵体沉淀进行溶解; 待包涵体沉淀溶解后, 取稀释复性Buffer (50mM Tris, 50mM NaCl, 500mM L-Arginine, 3mM GSSG, 1mM GSH, 1mM DTT, pH8.0) 于溶解的重组蛋白GST-TvbS1进行稀释复性48h, 待复性结束后, 取所得溶液于含有20mM Tris、50mM NaCl pH=8.0的水溶液中进行透析浓缩16h; 透析结束后, 提取浓缩液中的上清蛋白即为重组蛋白GST-TvbS1, 通过13% SDS-PAGE电泳对重组蛋白GST-TvbS1进行检测, 使用专业分析软件Grab-it 2.5分析重组蛋白GST-TvbS1的纯度, 并采用BCA方法测定重组蛋白GST-TvbS1的蛋白浓度;

[0059] 步骤四、抗鸡tvb抗原结合位点多克隆抗体的制备

[0060] 对重组蛋白GST-TvbS1进行蛋白浓度测定, 并取2只新西兰兔 (新西兰白兔重量为2~2.5kg) 进行皮下免疫, 2~3周免疫一次, 每次重组蛋白GST-TvbS1的免疫量为400 μ g, 共免疫4次; 提取兔血制备抗血清, 得到本发明实施例的抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体。

[0061] 对实施例一所得抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体的特异性检测方法如下:

[0062] 步骤一: 取5 μ g/ml的GST-TvbS1重组蛋白液作为包被抗原, 按照100 μ l/孔的加入量对ELISA板进行包被, 包被完成后弃去溶液; 使用pH为7.4的PBS作为缓冲液对ELISA板进行包被;

[0063] 步骤二: 取本发明实施例的抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体分为6组, 向各组中加入PBS缓冲液, 将各组分别稀释至500、1500、4500、13500、40500和121500倍, 向步骤一所得ELISA板中分别加入稀释后的6组抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体, 每孔加入抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体50 μ l, 并在37 $^{\circ}$ C下培育2h, 弃去溶液, 使用浓度为0.02mol/L的PBS溶液对ELISA板洗涤3次后, 每孔加入羊抗兔-HRP 100 μ l, 在37 $^{\circ}$ C下培育1h后, 加入100 μ l TMB反应显色10min, 然后使用450nm波长的ELISA读板机进行读数, 并采用Western Blot对抗体与抗原的特异性反应进行检测。

[0064] 对空白组的特异性检测方法如下:

[0065] 步骤一: 取5 μ g/ml的GST-TvbS1重组蛋白液作为包被抗原, 按照100 μ l/孔加入量对ELISA板进行包被, 包被完成后弃去溶液; 使用pH为7.4的PBS作为缓冲液对ELISA板进行包被;

[0066] 步骤二: 向步骤一所得ELISA板中加入PBS作为缓冲液, 每孔加入PBS缓冲液50 μ l, 并在37 $^{\circ}$ C下培育2h, 弃去溶液, 使用浓度为0.02mol/L的PBS溶液对ELISA板洗涤3次后, 每孔加入羊抗兔-HRP 100 μ l, 在37 $^{\circ}$ C下培育1h后, 加入100 μ l TMB显色液反应显色10min, 然后在使用450nm波长的ELISA读板机进行读数, 所得读数值为空白组检测值。

[0067] 空白组、实施例一的特异性检测结果如下表所示

	组名	稀释倍数	A450nm
			实施例一
[0068]	1	500	3.046
	2	1500	2.946
	3	4500	2.932
	4	13500	2.914
	5	40500	2.805
[0069]	6	121500	2.718
	7	空白组	0.121

[0070] 效价即样品OD/空白 ≥ 2.1 的最高稀释度

[0071] 本发明实施例一所得抗鸡CAR1蛋白多克隆抗体的特异性检测结果如上表所示,实施例一的多克隆抗体在稀释至500倍与稀释至121500倍后,在450nm波长下仍具有较高的检测数值,且稀释倍数对检测数值的影响较小,说明实施例一所制备的多克隆抗体对GST-TvbS1重组蛋白具有较高的特异性识别能力,在浓度被大量稀释的情况下仍能与GST-TvbS1重组蛋白快速结合,对GST-TvbS1重组蛋白具有高度的特异性。

[0072] 本发明实施例通过对鸡tvb基因的提取、克隆和原核表达,快速有效的制备大量重组蛋白 GST-TvbS1,利用重组蛋白GST-TvbS1作为抗原制备抗鸡CAR1蛋白的抗体,使所得抗鸡CAR1 蛋白的抗体对GST-TvbS1重组蛋白具有高度特异性,解决现有抗体中缺少针对鸡的CAR1蛋白具有高特异性的问题。本发明实施例所制备的抗鸡CAR1蛋白的多克隆抗体因其所具有的高度特异性,可以对鸡CAR1蛋白进行更好更有效的研究,进而有效促进对B亚型禽白血病病毒的研究。

[0073] 最后应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对其限制,尽管参照上述实施例对本发明进行了详细的说明,所属领域的普通技术人员应当理解,技术人员阅读本申请说明书后依然可以对本发明的具体实施方式进行修改或者等同替换,但这些修改或变更均未脱离本发明申请待批权利要求保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 广东省农业科学院动物科学研究所
- [0003] <120> 一种抗鸡CAR1蛋白的多克隆抗体及其制备方法
- [0004] <130> PY1810008
- [0005] <141> 2018-01-09
- [0006] <160> 4
- [0007] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 1107
- [0010] <212> DNA
- [0011] <213> 鸡(Gallus gallus domesticus)
- [0012] <400> 1
- [0013] atgcgctcag ctgcgctccg gttgtgcccc gttctactgc tgctcttcgc ggaggttcag 60
- [0014] ttgggatctg ctgcagcagt gaagaagagg gcagacaggt cagacctcca gaagccagac 120
- [0015] ctctacagaa ggaagtgtcc tatgggcacc tatgaggcaa atgactccat ccagtgcctc 180
- [0016] ccatgtaaga aagacgagta caccgagtat ccaaataact ttcccaagt cctgggctgc 240
- [0017] cggacgtgta gggaagacca ggtggagggtg agtccctgca tccccaccag gaacacgcag 300
- [0018] tgcgcttgca agaacggcac cttctgctta cctgaccacc cctgtgagat gtgccaaaag 360
- [0019] tgccagaccg agtgccccaaggacaagt aggttagctc cgtgcacgca acacagcgac 420
- [0020] ctgctgtgcg gtccaccctt ggaaatctcc tccagctcct ccactttatg gatcatcatc 480
- [0021] accttcaccg tgctgctggc tgtgatcctg gggctcgtgc tgggtgttctg gaagaggtgc 540
- [0022] tcctccagac accacgggtgc aggggatgat ggagagctga gctggaagcc cagcgccgtg 600
- [0023] gtgaacagac tgttcgacgc gctggggatt caggacaaca gatgcaatga gcagatctac 660
- [0024] cagaaccagc agcagcagga gctgcttttc acagcgcagg gctcagaggt tccccatggt 720
- [0025] gtggagatgg aggggacgga acgaagaacc ccagatccca aagtggaaac ccagaggaag 780
- [0026] ctggttccag tgctaggaga gaaccccata gcccttttgc atcgctcttt caacaccttt 840
- [0027] gtcgactatg tgcccttccc ggaatggaag agatttgcc gagccctcga cctgcaggaa 900
- [0028] aacgaccttt atctggcaga gcagcagcagc aggggtctcat gtgagccgtt ctatcagatg 960
- [0029] ctcaacacgt ggctcaacca acagggcagc aaagcctctg tgaatacgt gctggagacc 1020
- [0030] ctgccccgca tcggcctcag cggcgtggca gacataattg catccgaact cattagcaag 1080
- [0031] ggctatttcc agtacgaggt gagctga 1107
- [0032] <210> 2
- [0033] <211> 465
- [0034] <212> DNA
- [0035] <213> 鸡(Gallus gallus domesticus)
- [0036] <400> 2
- [0037] atgcgctcag ctgcgctccg gttgtgcccc gttctactgc tgctcttcgc ggaggttcag 60
- [0038] ttgggatctg ctgcagcagt gaagaagagg gcagacaggt cagacctcca gaagccagac 120
- [0039] ctctacagaa ggaagtgtcc tatgggcacc tatgaggcaa atgactccat ccagtgcctc 180
- [0040] ccatgtaaga aagacgagta caccgagtat ccaaataact ttcccaagt cctgggctgc 240
- [0041] cggacgtgta gggaagacca ggtggagggtg agtccctgca tccccaccag gaacacgcag 300

[0042] cgcgcttgca agaacggcac cttctgctta cctgaccacc cctgtgagat gtgccaaaag 360
[0043] tgccagaccg agtgccccaa aggacaagtg aggttagctc cgtgcacgca acacagcgac 420
[0044] ctgctgtgcg gtccaccctt ggaaatctcc tccagctcct ccact 465
[0045] <210> 3
[0046] <211> 28
[0047] <212> DNA
[0048] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0049] <400> 3
[0050] catgggatcc atgcgctcag ctgcgctc 28
[0051] <210> 4
[0052] <211> 28
[0053] <212> DNA
[0054] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0055] <400> 4
[0056] catgctcgag agtggaggag ctggagga 28

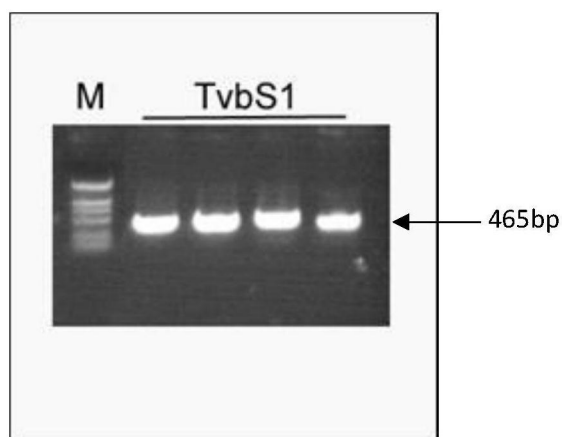


图1

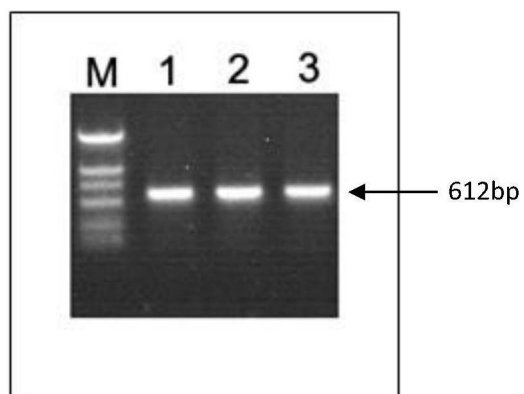


图2

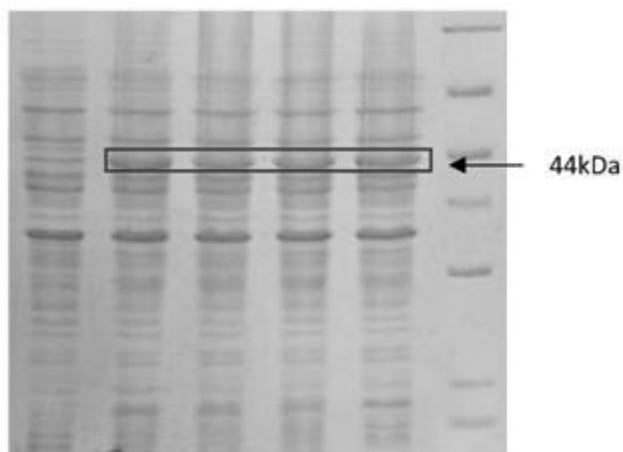


图3