



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109879959 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201910204431.2

(22)申请日 2019.03.18

(71)申请人 王兴龙

地址 712100 陕西省咸阳市杨凌示范区邠
成北路3号西农校区家属院人才公寓
3-261

(72)发明人 王兴龙 贺艳芬 杨增岐 李明恒
王振斌

(74)专利代理机构 北京同辉知识产权代理事务
所(普通合伙) 11357

代理人 孙艳敏

(51)Int.Cl.

C07K 16/00(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

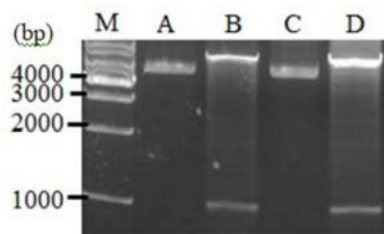
权利要求书2页 说明书13页 附图3页

(54)发明名称

大熊猫IgG Fc片段的原核表达及其多克隆
抗体制备的方法

(57)摘要

本发明公开了大熊猫IgG Fc片段的原核表
达及其多克隆抗体制备的方法,首次选用原核表
达系统表达大熊猫IgG Fc恒定区,用构建好的含
有大熊猫IgG Fc片段基因的重组载体pMAL-C4x-
PFc转化DH5 α 菌,提取质粒用BamH I和Hind III
酶切鉴定后转化BL21菌,经过诱导条件的优化,
成功实现大熊猫IgG Fc片段的大量可溶性表达,
用亲和层析法分离得到较纯的重组蛋白;将亲和
层析获得的较纯可溶性重组蛋白与弗氏佐剂充
分乳化后3次免疫健康小鼠,3次免疫1周后采集
鼠血清,用间接ELISA测多克隆抗体效价非常高,
成功制备了效价高、稳定性好的大熊猫多克隆抗
体。



1. 一种大熊猫IgG Fc片段(PFc)的原核表达方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 构建重组表达载体:将PFc插入pMAL-C4x载体的BamH I和Hind III酶切位点之间,得到pMAL-C4x-PFc重组载体;

(2) 重组质粒转化大肠杆菌DH5 α 菌,将步骤(1)中得到的pMAL-C4x-PFc重组载体与培养的DH5 α 菌进行混合培养,获得了表达PFc的重组DH5 α 菌;

(3) 重组质粒的提取:氨苄抗性筛选步骤(2)中得到的重组DH5 α 菌,培养氨苄抗性筛选后的重组DH5 α 菌至OD600值达到0.6-0.8,使用试剂盒提取培养后的重组DH5 α 菌的重组质粒,得到pMAL-C4x-PFc重组质粒;

(4) 重组质粒转化甘油菌BL21菌:将步骤(3)中得到的pMAL-C4x-PFc重组质粒与培养的BL21菌进行混合培养,获得了重组BL21菌;

(5) 重组BL21菌的诱导表达:氨苄抗性筛选步骤(4)中得到的重组BL21菌并且进行培养至OD600值达到0.6-0.8,使用诱导剂诱导表达培养后的重组BL21菌,离心后使用蛋白纯化结合平衡缓冲液重悬沉淀,超声破碎重悬后的重组BL21菌菌体至菌液具有透光性,得到表达的重组蛋白。

2. 根据权利要求1所述的大熊猫IgG Fc片段(PFc)的原核表达的方法,其特征在于,步骤(3)中,还包括重组质粒的鉴定:测定重组DH5 α 菌的重组质粒的浓度和原pMAL-C4x-PFc重组载体的重组质粒的浓度,采用BamH I和Hind III两种限制性核酸内切酶切割重组DH5 α 菌的重组质粒和原pMAL-C4x-PFc重组载体的重组质粒,并且测定切割后各重组质粒的质粒浓度;并且将重组DH5 α 菌的重组质粒和原pMAL-C4x-PFc重组载体的重组质粒以及它们的BamH I和Hind III两种限制性核酸内切酶切割的酶切产物使用核酸电泳进行大小比对。

3. 根据权利要求1所述的大熊猫IgG Fc片段(PFc)的原核表达的方法,其特征在于,步骤(5)中,使用诱导剂诱导表达培养后的重组BL21菌,其中诱导温度为25-40 $^{\circ}$ C。

4. 根据权利要求1所述的大熊猫IgG Fc片段(PFc)的原核表达的方法,其特征在于,步骤(5)中,使用诱导剂诱导表达培养后的重组BL21菌,其中诱导剂为IPTG,诱导剂浓度为0.1-1.5mmol/L。

5. 根据权利要求1所述的大熊猫IgG Fc片段(PFc)的原核表达的方法,其特征在于,步骤(5)中,使用诱导剂诱导表达培养后的重组BL21菌,其中诱导时间为1-8h。

6. 根据权利要求1所述的大熊猫IgG Fc片段(PFc)的原核表达的方法,其特征在于,步骤(5)中,超声破碎重悬后的重组BL21菌菌体时,在冰浴情况下进行超声,并且每超声4-6s间隔2-4s以确保散热充分。

7. 根据权利要求1所述的大熊猫IgG Fc片段(PFc)的原核表达的方法,其特征在于,还包括步骤(6):重组蛋白的纯化:使用亲和层析法纯化步骤(5)中得到的重组蛋白,其中洗脱液中为纯化的重组蛋白。

8. 使用权利要求1-7任一项所述的大熊猫IgG Fc片段(PFc)的原核表达的方法得到的重组蛋白制备多克隆抗体的方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1:重组蛋白浓度的测定:使用亲和层析法分离得到了纯化的大熊猫IgG Fc片段的原核表达的重组蛋白,利用蛋白质灰度分析软件测纯化的重组蛋白的IOD值,使用蛋白Marker作为参照,得出纯化的重组蛋白的浓度值;

S2:多克隆抗体的制备:将纯化的重组蛋白与等量弗氏完全佐剂混合乳化,乳化至滴入

水中15s不散开,将乳化后的重组蛋白分点皮下注射小鼠进行免疫,每隔两周一次,共进行三次免疫,其中前两次小鼠注射重组蛋白的注射量达到80-120 μ g,第三次免疫后6-8天,对免疫小鼠进行眼球采血,血液室温放置待其自然凝固后,进行离心取上清即血清,得到多克隆抗体。

9. 根据权利要求8所述的制备多克隆抗体的方法,其特征在于,还包括步骤S3:多克隆抗体效价的检测:使用辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠IgG酶标二抗,使用酶联免疫吸附试验(ELISA)确定重组蛋白最佳包被稀释浓度,稀释为最佳包被浓度稀释比例后的纯化重组蛋白经过处理后分别与免疫小鼠、非免疫小鼠的血清混合后进行倍比稀释,孵育洗涤甩干后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠IgG酶标二抗进行孵育,使用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)计算多克隆抗体的效价。

10. 权利要求8或9所述的制备多克隆抗体的方法制备获得的大熊猫多克隆抗体。

大熊猫IgG Fc片段的原核表达及其多克隆抗体制备的方法

技术领域

[0001] 本发明属于在生物技术的领域,具体涉及一种大熊猫IgG Fc片段的原核表达及其多克隆抗体制备的方法。

背景技术

[0002] 目前,大熊猫是濒危珍稀动物,我们国家采取了很多的措施来拯救和保护大熊猫,比如建立大熊猫自然保护区,通过人工繁育大熊猫增加种群数量等。人工饲养大熊猫其营养配置比野外高很多,但寿命却明显低于野外生存的大熊猫,而且圈养大熊猫繁殖能力明显下降;另外,圈养条件下,疫病问题也是困扰大熊猫保护的关键瓶颈问题之一。有效的疾病检测对于保护大熊猫意义重大,但目前诊断大熊猫疫病的特异性检测方法较少,这与缺少大熊猫特异性抗体有关。

[0003] 大肠杆菌的原核表达系统诱导表达的重组蛋白一半以上以包涵体的形式存在,可溶性蛋白仅为总表达蛋白的13.3%-23%,不能够大量可溶性表达蛋白。

[0004] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供大熊猫IgG Fc片段的原核表达及其多克隆抗体制备的方法,首次选用原核表达系统表达大熊猫IgG Fc恒定区,用构建好的含有大熊猫IgG Fc片段基因的重组载体pMAL-C4x-PFc转化DH5 α 菌,提取质粒用BamH I和Hind III酶切鉴定后转化BL21菌,经过诱导条件的优化,成功实现大熊猫IgG Fc片段的大量可溶性表达,用Dextrin Beads 6FF亲和层析法分离得到较纯的重组蛋白;将亲和层析获得的较纯可溶性重组蛋白与弗氏佐剂充分乳化后3次免疫健康小鼠,3次免疫1周后采集鼠血清,用间接ELISA测多克隆抗体效价非常高;同时,用制备的多克隆抗体与大熊猫血清IgG反应,反应性良好,3次重复试验,检测结果一致性良好;与健康猪、羊、兔子以及鸡血清反应,制备的抗体与猪、羊和兔子血清存在交叉反应性,与鸡血清交叉反应微弱。本试验成功制备了效价高、稳定性好的大熊猫多克隆抗体,将制备的多克隆抗体与酶结合偶联形成酶标抗原,可用于大熊猫多种传染病、寄生虫病以及其他疾病的血清学诊断;同时,可以用辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠IgG酶标二抗,建立间接ELISA方法用于大熊猫血清抗体分析,特别是针对某种严重威胁大熊猫健康的重要疫病。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供一种大熊猫IgG Fc片段(PFc)的原核表达的方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 构建重组表达载体:将PFc插入pMAL-C4x载体的BamH I和Hind III酶切位点之间,得到pMAL-C4x-PFc重组载体;

[0008] (2) 重组质粒转化大肠杆菌DH5 α 菌,将步骤(1)中得到的pMAL-C4x-PFc重组载体与培养的DH5 α 菌进行混合培养,获得了表达PFc的重组DH5 α 菌;

[0009] (3) 重组质粒的提取:氨苄抗性筛选步骤(2)中得到的重组DH5 α 菌,培养氨苄抗性

筛选后的重组DH5 α 菌至OD600值达到0.6-0.8,使用试剂盒提取培养后的重组DH5 α 菌的重组质粒,得到pMAL-C4x-PFc重组质粒;

[0010] (4) 重组质粒转化甘油菌BL21菌:将步骤(3)中得到的pMAL-C4x-PFc重组质粒与培养的BL21菌进行混合培养,获得了重组BL21菌;

[0011] (5) 重组BL21菌的诱导表达:氨苄抗性筛选步骤(4)中得到的重组BL21菌并且进行培养至OD600值达到0.6-0.8,使用诱导剂诱导表达培养后的重组BL21菌,离心后使用蛋白纯化结合平衡缓冲液重悬沉淀,超声破碎重悬后的重组BL21菌菌体至菌液具有透光性,得到表达的重组蛋白。

[0012] 进一步地,步骤(3)中,还包括重组质粒的鉴定:测定重组DH5 α 菌的重组质粒的浓度和原pMAL-C4x-PFc重组载体的重组质粒的浓度,采用BamH I和Hind III两种限制性核酸内切酶切割重组DH5 α 菌的重组质粒和原pMAL-C4x-PFc重组载体的重组质粒,并且测定切割后各重组质粒的质粒浓度;并且将重组DH5 α 菌的重组质粒和原pMAL-C4x-PFc重组载体的重组质粒以及它们的BamH I和Hind III两种限制性核酸内切酶切割的酶切产物使用核酸电泳进行大小比对。

[0013] 优选地,步骤(5)中,使用诱导剂诱导表达培养后的重组BL21菌,其中诱导温度为25-40 $^{\circ}$ C。

[0014] 优选地,步骤(5)中,使用诱导剂诱导表达培养后的重组BL21菌,其中诱导剂为IPTG,诱导剂浓度为0.1-1.5mmol/L。

[0015] 优选地,步骤(5)中,使用诱导剂诱导表达培养后的重组BL21菌,其中诱导时间为1-8h。

[0016] 优选地,步骤(5)中,超声破碎重悬后的重组BL21菌菌体时,在冰浴情况下进行超声,并且每超声4-6s间隔2-4s以确保散热充分。

[0017] 进一步地,还包括步骤(6):重组蛋白的纯化:使用亲和层析法纯化步骤(5)中得到的重组蛋白,其中洗脱液中为纯化的重组蛋白。

[0018] 本发明还提供一种使用上述的大熊猫IgG Fc片段(PFc)的原核表达的方法得到的重组蛋白制备多克隆抗体的方法,包括以下步骤:

[0019] S1:重组蛋白浓度的测定:使用亲和层析法分离得到了纯化的大熊猫IgG Fc片段的原核表达的重组蛋白,利用蛋白质灰度分析软件测纯化的重组蛋白的IOD值,使用蛋白Marker作为参照,得出纯化的重组蛋白的浓度值;

[0020] S2:多克隆抗体的制备:将纯化的重组蛋白与等量弗氏完全佐剂混合乳化,乳化至滴入水中15s不散开,将乳化后的重组蛋白分点皮下注射小鼠进行免疫,每隔两周一次,共进行三次免疫,其中前两次小鼠注射重组蛋白的注射量达到80-120 μ g,第三次免疫后6-8天,对免疫小鼠进行眼球采血,血液室温放置待其自然凝固后,进行离心取上清即血清,得到多克隆抗体。

[0021] 进一步地,还包括步骤S3:多克隆抗体效价的检测:使用辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠IgG酶标二抗,使用酶联免疫吸附试验(ELISA)确定重组蛋白最佳包被稀释浓度,稀释为最佳包被浓度稀释比例后的纯化重组蛋白经过处理后分别与免疫小鼠、非免疫小鼠的血清混合后进行倍比稀释,孵育洗涤甩干后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠IgG酶标二抗进行孵育,使用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)计算多克隆抗体的效价。

[0022] 本发明还提供一种使用上述的制备多克隆抗体的方法制备获得的大熊猫多克隆抗体。

[0023] 本发明提供的大熊猫IgG Fc片段的原核表达及其多克隆抗体制备的方法,具有如下有益效果:

[0024] 1、选用原核表达系统表达大熊猫IgG Fc恒定区,选用MBP融合标签促进大熊猫IgG Fc片段的大量可溶性表达,利用化学转化法获得了可以表达大熊猫IgG Fc片段的重组大肠杆菌,同时便于利用亲和层析法分离得到较纯的重组蛋白;将构建好的含有大熊猫IgG Fc片段基因的重组载体pMAL-C4x-PFc转化BL21菌,经过诱导条件的优化确定了含有大熊猫IgG Fc片段的重组菌表达的相对适宜条件是37℃,IPTG浓度0.5mM,诱导表达5h,成功实现大熊猫IgG Fc片段的大量可溶性表达;利用Dextrin Beads 6FF亲和层析分离成功得到了较纯的可溶性重组蛋白,可溶性重组蛋白的平均浓度达到265.85μg/mL;

[0025] 2、用ELISA方法对制备的多克隆抗体效价、稳定性和特异性进行了检测,制备的多克隆抗体与大熊猫血清IgG反应性良好,试验差异率较低,多克隆抗体效价高、稳定性较好;制备的多克隆抗体与猪、羊和兔子血清存在交叉反应性,与鸡血清交叉反应微弱。

附图说明

[0026] 图1为具体实施方式中的双酶切法鉴定pMAL-C4x-PFc重组质粒的电泳图。

[0027] 图2为具体实施方式中不同诱导温度下的pMAL-C4x-PFc重组质粒的表达结果电泳图。

[0028] 图3为具体实施方式中IPTG诱导剂不同浓度下的pMAL-C4x-PFc重组质粒的表达结果电泳图。

[0029] 图4为具体实施方式中IPTG诱导剂不同诱导时间下的pMAL-C4x-PFc重组质粒的表达结果电泳图。

[0030] 图5为具体实施方式中在适宜表达条件下pMAL-C4x-PFc重组蛋白的表达结果电泳图。

[0031] 图6为具体实施方式中pMAL-C4x-PFc重组蛋白的纯化结果电泳图。

[0032] 图7为具体实施方式中制备的鼠源多克隆抗体与大熊猫血清、猪、羊、兔和鸡血清反应特异性的检验结果。

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,下面结合具体实施方式对本发明作进一步的详细说明。

[0034] 一、大熊猫IgG Fc片段的原核表达与纯化

[0035] 1、材料

[0036] (1) 质粒与细胞

[0037] 本实验室-80℃温度下保存的大肠杆菌DH5α和大肠杆菌BL21, pMAL-C4x-PFc重组载体由公司前期构建保存。

[0038] (2) 主要溶液

[0039] DNA上样缓冲液、1×TAE溶液、TSB培养基、氨苄抗性LB(Luria-Bertani)培养基、无

抗性LB (Luria-Bertani) 培养基、2YT培养基、KCM溶液、SDS-PAGE电泳缓冲液、75%甘油溶液、SDS-PAGE上样缓冲液、10%过硫酸铵、考马斯亮蓝R-250染色液与脱色液、MBP标签蛋白纯化用结合/洗杂缓冲液与洗脱缓冲液、IPTG (异丙基硫代半乳糖苷) 溶液。

[0040] (3) 主要仪器设备

[0041] 纯水仪、高压蒸汽灭菌锅、核酸电泳仪、微量分光光度计、超净工作台、水浴锅、恒温振荡摇床、凝胶成像系统、离心机、电子天平、微波炉、冰箱、恒温培养箱、移液枪、蛋白电泳仪、制冰机、超声破碎仪。

[0042] 2、大熊猫IgG Fc片段的原核表达与纯化的方法,包括以下步骤:

[0043] (1) 重组表达载体的构建

[0044] 根据GenBank收录的大熊猫IgG Fc片段 (PFc), 将PFc插入pMAL-C4x载体的BamH I和Hind III酶切位点之间, 合成pMAL-C4x-PFc重组载体。

[0045] (2) 重组载体转化DH5 α 菌

[0046] 将-80 $^{\circ}$ C保存的DH5 α 菌取出溶解, 在无抗性的LB固体培养皿上进行划线复苏, 划线后的LB固体培养皿在37 $^{\circ}$ C恒温温箱内倒置过夜培养12-16h。培养后用白枪头挑取LB固体培养皿上长出的单菌落于3mL无抗性LB液体培养基中于37 $^{\circ}$ C 200rpm恒温振荡摇床上过夜培养12~16h, 振荡观察菌液呈雾状即可停止培养。将培养后的3mL菌液分两次倒入1.5mL的微量离心管, 两次均以12000rpm分别离心1min, 两次离心都弃掉上清溶液, 保留沉淀。向两次离心后的沉淀中加入50 μ L的TSB培养基充分悬浮沉淀, 再加入3 μ L的pMAL-C4x-PFc重组载体与10 μ L的KCM溶液充分混匀, 另外取37 μ L的无抗性LB液体培养基补齐100 μ L体系, 冰浴20min后室温放置10min, 于超净台内向上述微量离心管中加入500 μ L的无抗性LB液体培养基, 于37 $^{\circ}$ C 200rpm恒温振荡摇床上培养15min, 之后5000rpm离心5min, 弃掉上清溶液, 保留沉淀, 用200 μ L的无抗性LB液体培养基重悬, 吸取100 μ L菌液用三角架涂布氨苄抗性的LB固体培养皿, 37 $^{\circ}$ C恒温温箱内倒置过夜培养, 观察菌落生长情况, 剩余100 μ L菌液放于4 $^{\circ}$ C备用。

[0047] (3) 重组质粒的提取与鉴定

[0048] 用白枪头挑取上步中氨苄抗性筛选后的DH5 α 单菌落于5mL的氨苄抗性的LB液体培养基里于37 $^{\circ}$ C 200rpm恒温振荡摇床上过夜培养大约14h, 根据质粒小提试剂盒说明书提取质粒50 μ L。用微量分光光度计测定提取的质粒浓度以及采用BamH I和Hind III两种限制性核酸内切酶切割提取的质粒浓度, 用微量分光光度计测定实验室原来保存的pMAL-C4x-PFc重组质粒的浓度以及采用BamH I和Hind III两种限制性核酸内切酶切割提取的pMAL-C4x-PFc重组质粒的浓度, 酶切条件为37 $^{\circ}$ C水浴4h, 酶切体系具体成分见表1。

[0049] 表1酶切反应体系 (单位: μ L)

[0050] 表1酶切反应体系 (单位: μ L)

[0051]

组分 (Components)	体积 (Volume)
提取的质粒 (Extracted plasmid)	7.0
<i>BamH</i> I	2.0
<i>Hind</i> III	2.0
K Buffer (10×)	3.0
ddH ₂ O	16.0
总体积 (Total Volume)	30.0

[0052] 称取0.25g琼脂糖加入25mL的1×TAE溶液,微波炉加热2min,每隔1min取出来摇晃观察是否溶解,待其变为无色透明的液体后取出。当温度降至50~60℃时,向其中加入2.5μL的Goldview混匀,其中GoldView是一种可代替溴化乙锭(EB)的新型核酸染料,倒入已经插好梳子的凹槽内,静置2~4h左右。将凝固好的1%的琼脂糖核酸凝胶放入核酸电泳仪内,原重组质粒、提取阳性菌落质粒以及它们的酶切产物分别与DNA上样缓冲液充分混合后点样,核酸电泳验证提取质粒是否正确。重组质粒的鉴定结果见图1。

[0053] 如图1所示,图中M列为DNA Marker,图中A列为原重组质粒,图中B列为原重组质粒双酶切产物,图中C列为提取阳性菌落质粒,图中D列为提取阳性菌落质粒双酶切产物;重组质粒pMAL-C4x-PFc转化DH5α菌氨苄抗性筛选出阳性菌落后成功提取质粒,用微量分光光度计测得提取阳性菌落的重组质粒浓度为220.6ng/μL。用*BamH* I和*Hind* III两种限制性核酸内切酶切割提取阳性菌落的质粒以及实验室原来保存的pMAL-C4x-PFc重组质粒,将原重组质粒、提取阳性菌落质粒以及它们的酶切产物和DNA Marker跑核酸电泳进行比对,发现原重组质粒与提取阳性菌落质粒大小一致,它们的酶切产物大小也一致。而大熊猫IgG Fc片段基因长度为1035bp,根据DNA Marker比对可知酶切产物正确,获得正确的pMAL-C4x-PFc重组质粒。

[0054] (4) 重组质粒转化BL21菌

[0055] 将-80℃保存的BL21菌取出室温溶解,在无抗性的LB固体培养皿上划线复苏,于37℃恒温温箱内倒置过夜培养12-16h。培养后用白枪头挑取无抗性的LB固体培养皿上长出的单菌落于3mL无抗性LB液体培养基于37℃200rpm恒温振荡摇床过夜培养12~16h,振荡观察菌液呈云雾状即可停止培养。将培养后的3mL菌液分两次倒入1.5mL的微量离心管,两次均以12000rpm分别离心1min,两次离心都弃掉上清溶液,保留沉淀。向两次离心后的沉淀中加入50μL的TSB培养基充分悬浮沉淀,再加入3μL的pMAL-C4x-PFc重组质粒与10μL的KCM溶液充分混匀,另外取37μL的无抗性LB液体培养基补齐100μL体系。冰浴20min后室温放置10min,于超净台内向上述微量离心管中加入500μL的无抗性LB液体培养基,于37℃200rpm恒温振荡摇床上培养15min,之后5000rpm离心5min,用200μL的无抗性LB液体培养基重悬,吸取100μL菌液用三角架涂布氨苄抗性的LB固体培养皿,37℃恒温温箱内倒置过夜培养,观察菌落生长情况,剩余100μL菌液放于4℃备用。

[0056] (5) 重组菌的诱导表达与条件的确定

[0057] 将1.0mm的配置SDS-PAGE凝胶的厚板和薄板洗净后擦干装在制胶架上,用琼脂粉

配置2%的溶液进行封底,按照碧云天生物技术研究所提供的配胶说明书配置12%的SDS-PAGE凝胶放于4℃备用。

[0058] a. 探索较适表达温度

[0059] 白枪头挑取阳性BL21菌落于5mL氨苄抗性的LB液体培养基(氨苄西林浓度为60μg/mL)中于37℃200rpm恒温振荡摇床上过夜培养大约12h,从过夜培养的菌液中吸取300μL于新的5mL氨苄抗性的2YT液体培养基(氨苄西林浓度为60μg/mL)中37℃200rpm恒温振荡摇床培养2~3h,使OD600值大概达到0.6~0.8时,向其中加入100mmol/L的IPTG溶液50μL,使IPTG终浓度为1.0mmol/L,随后在25℃、30℃和37℃下,分别诱导表达4h,同时用没有转化pMAL-C4x-PFc重组质粒的空BL21菌作为对照组。分别取上述诱导表达后的氨苄阳性BL21菌液和空BL21菌液各80μL与20μL的5×SDS-PAGE上样缓冲液充分混合,100℃水浴加热10min后降至室温备用。将配置好的12%的SDS-PAGE胶放入蛋白质电泳仪内,加入新配置的蛋白电泳缓冲液,小心翼翼地将梳子从胶内拔出,将各样品20μL以及5μL的蛋白Marker点进样品孔进行SDS-PAGE电泳,用考马斯亮蓝R-250染色液均匀染1h后,加入适量脱色液于微波炉里加热脱色,每隔5min换一次脱色液,成功脱色后用凝胶成像系统照胶进行分析。若其成功表达,则进一步筛选出表达量相对较多的诱导温度,同时用甘油保存诱导表达前的重组菌液1mL。

[0060] 如图2所示,图中M列为蛋白Marker,图中A列为空BL21菌液,图中B列为诱导温度为25℃的氨苄阳性BL21菌液,图中C列为诱导温度为30℃的氨苄阳性BL21菌液,图中D列为诱导温度为37℃的氨苄阳性BL21菌液;氨苄阳性BL21菌在25℃、30℃和37℃下,加入适量终浓度为1.0mmol/L的诱导剂IPTG诱导4h后,经SDS-PAGE电泳结果观察,几种温度条件下,重组蛋白都可以获得表达,表达量相对较多的条件是37℃。

[0061] b. 探索较适诱导剂浓度

[0062] 取30μL上述步骤a中保存于甘油中的重组菌液加入5mL的氨苄抗性的LB液体培养基(氨苄西林浓度为60μg/mL)中37℃200rpm恒温振荡摇床过夜培养大约12h,从过夜培养的菌液中吸取300μL于新的5mL的氨苄抗性的2YT液体培养基(氨苄西林浓度为60μg/mL)中37℃200rpm恒温振荡摇床培养2~3h,使OD600值大概达到0.6~0.8时,向其中加入IPTG溶液使IPTG终浓度分别为0.1mmol/L、0.5mmol/L、1.0mmol/L、1.5mmol/L,在上步筛选出的表达量相对较多的温度37℃下,诱导表达4h,同时用没有转化pMAL-C4x-PFc重组质粒的空BL21菌作为对照组。分别取上述诱导表达后的菌液各80μL与20μL的5×SDS-PAGE上样缓冲液充分混合,100℃水浴加热10min后降至室温备用。将配置好的12%的SDS-PAGE胶放入蛋白质电泳仪内,加入新配置的蛋白电泳缓冲液,将各样品20μL以及5μL的蛋白Marker点进样品孔进行SDS-PAGE电泳,染色和脱色后用凝胶成像系统观察结果,进一步探索出表达量相对较多的诱导浓度。

[0063] 如图3所示,图中M列为蛋白Marker,图中A列为空BL21菌液,图中B列为诱导浓度为0.1mmol/L的氨苄阳性BL21菌液,图中C列为诱导浓度为0.5mmol/L的氨苄阳性BL21菌液,图中D列为诱导浓度为1.0mmol/L的氨苄阳性BL21菌液,图中E列为诱导浓度为1.5mmol/L的氨苄阳性BL21菌液;氨苄阳性BL21菌在37℃下,加入适量终浓度分别为0.1mmol/L、0.5mmol/L、1.0mmol/L、1.5mmol/L的诱导剂IPTG诱导4h后,经SDS-PAGE电泳结果观察,几种诱导剂浓度条件下,重组蛋白都可以获得表达,表达量相对较多的条件是诱导剂IPTG浓度为

0.5mmol/L。

[0064] c. 探索较适表达时间

[0065] 取30 μ L上述步骤a中保存于甘油中的重组菌液加入5mL的氨苄抗性的LB液体培养基(氨苄西林浓度为60 μ g/mL)中于37 $^{\circ}$ C 200rpm恒温振荡摇床过夜培养大约12h,从过夜培养的菌液中吸取300 μ L于新的5mL的氨苄抗性的2YT液体培养基(氨苄西林浓度为60 μ g/mL)中于37 $^{\circ}$ C 200rpm恒温振荡摇床培养2~3h,使OD₆₀₀值大概达到0.6~0.8时,在探索出的表达量相对较多的IPTG浓度0.5mmol/L和诱导温度37 $^{\circ}$ C下,分别诱导表达1h、2h、3h、4h、5h、6h、7h、8h,同时用没有转化pMAL-C4x-PF_c重组质粒的空BL21菌作为对照组。分别取上述诱导表达后的菌液各80 μ L与20 μ L的5 \times SDS-PAGE上样缓冲液充分混合,100 $^{\circ}$ C水浴加热10min后降至室温备用。将配置好的12%的SDS-PAGE胶放入蛋白质电泳仪内,加入新配置的蛋白电泳缓冲液,将各样品20 μ L以及5 μ L的蛋白Marker点进样品孔进行SDS-PAGE电泳,染色和脱色后用凝胶成像系统观察结果,进一步探索出表达量相对较多的诱导时间。

[0066] 如图4所示,图中M列为蛋白Marker,图中A列为空BL21菌液,图中B列为诱导时间为1h的氨苄阳性BL21菌液,图中C列为诱导时间为2h的氨苄阳性BL21菌液,图中D列为诱导时间为3h的氨苄阳性BL21菌液,图中E列为诱导时间为4h的氨苄阳性BL21菌液,图中F列为诱导时间为5h的氨苄阳性BL21菌液,图中G列为诱导时间为6h的氨苄阳性BL21菌液,图中H列为诱导时间为7h的氨苄阳性BL21菌液,图中I列为诱导时间为8h的氨苄阳性BL21菌液;氨苄阳性BL21菌在37 $^{\circ}$ C下,加入适量终浓度为0.5mmol/L的诱导剂IPTG分别诱导表达1h、2h、3h、4h、5h、6h、7h、8h后,经SDS-PAGE电泳结果观察,几种诱导剂时间条件下,重组蛋白都可以获得表达,表达量相对较多的条件是诱导剂IPTG诱导时间为5h。

[0067] (6) 重组蛋白的大量表达

[0068] 取30 μ L上述步骤(5) a中保存于甘油中的重组菌液加入5mL的氨苄抗性的LB液体培养基(氨苄西林浓度为60 μ g/mL)中37 $^{\circ}$ C 200rpm恒温振荡摇床过夜培养大约12h,从培养后的菌液中吸取2mL于新的500mL的氨苄抗性的2YT液体培养基(氨苄西林浓度为60 μ g/mL)中37 $^{\circ}$ C 200rpm恒温振荡摇床培养2~3h,使OD₆₀₀值大概达到0.6~0.8时,在步骤(5)探索出的表达量相对较多的条件37 $^{\circ}$ C、诱导剂IPTG终浓度为0.5mmol/L、诱导时间5h下,诱导表达重组菌,6000rpm离心10min后弃掉上清液,用5mL的0.05mol/L Tris-HCL蛋白纯化结合平衡缓冲液重悬沉淀,在冰浴情况下用超声破碎仪破碎菌体,每超声5s间隔3s确保散热充分,减少因超声破碎而降解的蛋白质的量。超声至菌液具有良好的透光性,超声后菌液6000rpm离心10min,收集沉淀和上清液,用5mL Tris-HCL蛋白纯化结合平衡缓冲液重悬沉淀,用没有转化pMAL-C4x-PF_c重组质粒的空BL21菌作为对照组。收集超声后菌液的上清液、重悬后的沉淀和空BL21菌各20 μ L以及5 μ L的蛋白Marker进行SDS-PAGE电泳,验证是否成功表达重组蛋白以及蛋白的可溶性。

[0069] 如图5所示,图中M列为蛋白Marker,A列为空BL21菌,B列为空BL21菌,C列为超声后菌液的上清液,D列为重悬后的沉淀;在步骤(5)探索出的表达量相对较多的条件37 $^{\circ}$ C、诱导剂IPTG终浓度为0.5mmol/L、诱导时间5h下,诱导表达重组菌,超声破碎菌体,离心后收集沉淀和上清液,用蛋白纯化结合平衡缓冲液重悬沉淀,经SDS-PAGE电泳分析重组蛋白表达形式,结果显示重组蛋白获得大量表达,且上清中的重组蛋白多于沉淀重悬液中的蛋白量。

[0070] (7) 重组蛋白的纯化:选用Dextrin Beads 6FF亲和层析法纯化重组蛋白,按照常

州天地人和生物公司说明书,先将Dextrin Beads 6FF装入层析柱内,用结合平衡缓冲液进行充分的平衡,将已经用0.45 μ m滤膜滤过处理的步骤(6)中的重悬后的沉淀样品进行上样处理,用洗杂缓冲液进行充分洗涤后洗脱重组蛋白,收集流出液、洗杂液和洗脱液。取超声后菌液的上清液、流出液、洗杂液、洗脱液和空BL21菌各20 μ L以及5 μ L的蛋白Marker进行SDS-PAGE电泳,染色和脱色后用凝胶成像系统观察结果。需把成功纯化出的重组蛋白长期保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱备用。

[0071] 如图6所示,图中M列为蛋白Marker,A列为空BL21菌,B列为超声后菌液的上清液,C列为流出液,D列为洗杂液,E列为洗脱液;选用Dextrin Beads 6FF亲和层析法纯化重组蛋白,按照常州天地人和生物公司说明书,装柱、平衡、上样、洗涤和洗脱后,分别收集流出液、洗涤液和洗脱液,取各样品进行SDS-PAGE电泳,结果显示流出液中还存在大量重组蛋白,洗脱液中成分较单一,主要为纯化的重组蛋白。

[0072] 本专利首次尝试选用原核表达系统表达大熊猫IgG Fc恒定区,虽然大肠杆菌原核表达系统具有培养简便、快速、经济实惠等优势,但是利用该表达体系诱导表达的重组蛋白一半以上以包涵体的形式存在,可溶性蛋白仅为总表达蛋白的13.3%~23%。本专利选用MBP融合标签促进大熊猫IgG Fc片段的大量可溶性表达,利用化学转化法获得了可以表达大熊猫IgG Fc片段的重组大肠杆菌,同时便于利用亲和层析法分离得到较纯的重组蛋白。将构建好的含有大熊猫IgG Fc片段基因的重组载体pMAL-C4x-PFc转化BL21菌,经过诱导条件的优化确定了含有大熊猫IgG Fc片段的重组菌表达的相对适宜条件是37 $^{\circ}$ C,IPTG浓度0.5mM,诱导表达5h,成功实现大熊猫IgG Fc片段的大量可溶性表达。利用Dextrin Beads 6FF亲和层析分离得到了较纯的可溶性重组蛋白,便于下一步制备大熊猫特异性抗体。

[0073] 二、大熊猫IgG Fc片段的原核表达的重组蛋白制备多克隆抗体的方法以及多克隆抗体的检测

[0074] 1、材料

[0075] (1) 实验动物与血清

[0076] 购自成都达硕实验动物有限公司的3~4周龄的SPFKM健康雄性小鼠8只;大熊猫血清;健康山羊血清;健康鸡血清;健康猪血清;健康兔血清。

[0077] (2) 主要试剂

[0078] 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自于雨辰化玻站;10 \times 洗涤剂、TMB以及终止液全部购自于MEDIAN公司;脱脂奶粉购自于美国BD公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠IgG酶标二抗购自ABclonal公司。

[0079] (3) 主要溶液

[0080] PBS缓冲液、10%的脱脂乳、抗原包被液。

[0081] (4) 主要仪器设备

[0082] 微量振荡器、三通阀、恒温培养箱、制冰机、纯水仪、多道移液枪、普通移液枪、高压蒸汽灭菌锅、离心机、冰箱、酶标仪、电子天平。

[0083] 2、大熊猫IgG Fc片段的原核表达的重组蛋白制备多克隆抗体的方法,包括以下步骤:

[0084] (1) 重组蛋白浓度的测定

[0085] 利用Dextrin Beads 6FF亲和层析分离得到了较纯的大熊猫IgG Fc片段的原核表

达的重组蛋白,利用蛋白质灰度分析软件Image-Pro Plus测其IOD值,用蛋白Marker作为参照,得出纯化的重组蛋白的平均浓度为265.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0086] (2) 多克隆抗体的制备

[0087] 将3~4周龄的SPFKM健康雄性小鼠8只饲养一周左右,防止其应激反应对试验造成影响。其中5只小鼠作为试验组,3只小鼠作为对照组。根据首次免疫小鼠要达到100 μg 剂量的需求,取2500 μL 纯化蛋白样(含重组蛋白0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)与2500 μL 弗氏完全佐剂混合乳化,乳化至滴入水中15s不散开,试验组小鼠颈部、胸部、背部皮下分点注射各约150 μL ,使得试验组每只小鼠的重组蛋白免疫剂量为500 $\mu\text{L}/\text{只}$ (含重组蛋白100 μg),各试验组小鼠注射相同剂量。间隔两周,从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出纯化的重组蛋白进行SDS-PAGE电泳,利用蛋白质灰度分析软件Image-Pro Plus重新测其IOD值,得出重组蛋白现有的浓度。相同方法与弗氏不完全佐剂制备疫苗样品,相同方和剂量对小鼠进行2次免疫,使每只试验小鼠注射量达到100 μg 左右。再间隔两周,采用上述方法,将适量纯化后重组蛋白与弗氏不完全佐剂等量混合进行3次免疫。3次免疫7天之后,8只小鼠眼球采血,室温放置2~4h,待其自然凝固,1000rpm离心3min,分装各鼠血清,一部分放置于4 $^{\circ}\text{C}$ 用于下一步检测,另一部分放置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存备用。

[0088] (3) 多克隆抗体效价的检测

[0089] 向酶标板第一排12孔中分别加入200 μL 的抗原包被液,剩余84孔各加入100 μL 的抗原包被液。向第一排12孔中分别加入4 μL 的纯化后重组蛋白,充分混匀后吸取100 μL 到这一列的下一个孔,各列依次进行倍比稀释,每一列最后一孔混匀后弃掉100 μL ,这样整个酶标板各孔都含有相同体积的液体,将酶标板封于密封袋内37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养2h,取出甩干各孔液体,用排枪吸取PBS缓冲液于微量振荡器上洗涤3次,每次3~5min。每次洗涤后,要将洗涤液尽量去除干净。用排枪向酶标板各孔各加入200 μL 用PBS配置的10%的脱脂乳,密封后放于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内培养2h,取出后同样方法洗涤3次后甩干。向酶标板第一列各孔分别加入200 μL 的PBS缓冲液,剩余各孔分别加入100 μL 的PBS缓冲液。5只试验组小鼠的血清各取8 μL 进行充分的混合,第一列各孔内分别加入5 μL ,充分混匀,吸取100 μL 到各排的下一个孔,各排依次进行倍比稀释,每一排最后一孔混匀后弃掉100 μL ,使整个酶标板各孔均含有100 μL 的混合液。酶标板密封后于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养1h,取出后用1 \times 洗涤液洗涤5次,每次3~5min。酶标板甩干后向各孔加入用PBS缓冲液1:5000稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠IgG酶标二抗50 μL ,密封后于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养30min。取出后同样用1 \times 洗涤液洗涤5次,每次3~5min。甩干后向各孔加入50 μL 的TMB,用锡箔纸封顶5~15min,再加入50 μL 的终止液终止反应。用酶标仪读取各孔OD450值,重复上述试验3次,确定重组蛋白最佳包被稀释浓度。

[0090] 纯化后的重组蛋白倍比稀释包被板子,进行ELISA试验,酶标仪读取OD450值,重复试验3次,对应各孔OD450值取平均值,结果显示平均OD450值最大为2.10,出现在D3孔,计算出纯化后重组蛋白的最佳稀释比例为1:400,见表2。

[0091] 表2重组蛋白最佳包被浓度的测定

[0092]

平均 OD 值 (Average OD value)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.99	1.92	1.96	1.91	1.96	1.93	1.98	1.95	1.81	1.77	1.50	1.22
B	1.98	2.00	1.97	2.08	1.98	1.95	1.97	1.86	1.81	1.66	1.21	0.87
C	1.96	2.09	2.07	2.02	1.90	2.00	1.84	1.92	1.60	1.23	0.82	0.53
D	2.08	2.02	2.10	1.85	1.97	1.90	1.74	1.56	1.16	0.88	0.48	0.26

[0093]

E	1.90	1.94	1.95	1.92	1.88	1.71	1.39	1.14	0.72	0.47	0.24	0.18
F	2.00	1.92	1.94	1.87	1.51	1.41	0.94	0.59	0.40	0.32	0.14	0.10
G	1.80	1.68	1.65	1.45	1.07	0.90	0.52	0.40	0.23	0.13	0.08	0.09
H	1.52	1.29	1.17	0.95	0.84	0.72	0.32	0.14	0.10	0.12	0.09	0.08

[0094] 96孔板各孔加入100 μ L稀释为最佳包被浓度稀释比例为1:400后的纯化重组蛋白,37 $^{\circ}$ C孵育2h,洗涤之后加入10%的脱脂乳,37 $^{\circ}$ C孵育2h,洗涤甩干后,向酶标板第一列各孔分别加入200 μ L的PBS缓冲液,剩余各孔分别加入100 μ L的PBS缓冲液。第一列各孔依次加入5只试验组和3只对照组小鼠血清各4 μ L,分别进行倍比稀释,每一排最后一孔混匀后弃掉100 μ L,使整个酶标板各孔均含有100 μ L的混合液。37 $^{\circ}$ C孵育1h洗涤甩干加入酶标二抗孵育后再充分洗涤甩干,加TMB避光显色,加入终止液终止反应,酶标仪读取OD450值,重复上述试验3次,计算制备的多克隆抗体的效价。

[0095] 用上述探索出的最佳稀释倍数稀释纯化的重组蛋白,包被酶标板各孔,按照试验方法进行ELISA试验,用酶标仪读取OD450值,重复3次,各试验组相同稀释度各孔平均OD450值与对照组相同稀释度各孔平均OD450值之比,当其比值大于等于2:1时,最大稀释倍数即为抗体效价,试验鼠4号制备的多克隆抗体效价为1:51200,其余4只试验小鼠制备的多克隆抗体效价在1:102400以上,见表3。

[0096] 表3多克隆抗体效价的测定(A450)

[0097]

平均 OD 值 (Average OD value)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.10	2.01	1.95	1.94	1.94	1.91	1.83	1.82	1.42	1.16	0.80	0.57
B	2.01	1.97	1.97	1.95	1.88	1.75	1.24	1.09	0.75	0.51	0.29	0.19
C	2.01	1.93	1.91	1.91	1.84	1.77	1.45	1.14	0.85	0.50	0.31	0.19
D	1.95	1.93	1.90	1.83	1.71	1.29	0.92	0.59	0.43	0.29	0.15	0.11
E	1.97	1.97	1.96	1.91	1.77	1.64	1.30	1.05	0.78	0.47	0.31	0.18
F	0.30	0.19	0.13	0.12	0.12	0.10	0.09	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07
G	0.19	0.13	0.11	0.11	0.10	0.09	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06
H	0.39	0.20	0.15	0.11	0.11	0.09	0.09	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06

[0098] 3、多克隆抗体的检测

[0099] 向酶标板第一列各孔分别加入200 μ L的PBS缓冲液,剩余各孔分别加入100 μ L的PBS缓冲液。酶标板第一排各孔分别加入大熊猫血清4 μ L,分别进行倍比稀释,每一排最后一孔混匀后弃掉100 μ L,使整个酶标板各孔均含有100 μ L的混合液,37 $^{\circ}$ C孵育1h洗涤甩干后,加入10%的脱脂乳包被板子,孵育洗涤甩干,第一列各孔分别加入等量混合的试验组小鼠血清5 μ L,按照上述测定最佳纯化后重组蛋白包被浓度的操作方法分别进行倍比稀释,用酶标仪读取OD450值,重复上述试验3次,确定大熊猫血清以及小鼠血清包被的最佳稀释倍数。

[0100] 包被大熊猫血清,进行ELISA试验,用酶标仪读取OD450值,重复试验3次,对应各孔OD450值取平均值,结果显示平均OD450值最大为2.13,出现在B2孔,计算出大熊猫血清的最佳稀释比例为1:100,小鼠血清的最佳稀释比例为1:80,见表4。

[0101] 表4大熊猫血清包被ELISA板检测结果

[0102]

平均 OD 值 (Average OD value)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.03	1.97	1.96	1.94	1.88	1.77	1.46	0.98	0.67	0.55	0.29	0.22
B	2.07	2.13	2.05	2.02	1.96	1.97	1.73	1.36	0.98	0.69	0.43	0.33
C	2.06	2.03	2.06	2.09	1.96	2.02	1.78	1.39	1.02	0.68	0.95	0.34
D	2.01	2.01	2.06	2.07	2.04	1.91	1.86	1.41	1.09	0.75	0.51	0.36
E	2.00	2.01	2.04	2.02	1.98	1.93	1.81	1.46	0.92	0.65	0.46	0.35
F	1.99	1.98	1.98	1.98	1.95	1.91	1.71	1.27	0.85	0.60	0.43	0.37
G	1.99	1.96	1.99	2.00	1.94	1.81	1.65	1.36	0.98	0.64	0.44	0.35
H	2.00	2.06	2.00	1.95	1.95	1.80	1.51	1.11	0.84	0.54	0.37	0.27

[0103] (1) 多克隆抗体稳定性的检测

[0104] 为测定制备的多克隆抗体的稳定性,分别进行批内和批间重复试验。按照最佳稀释比例1:80用抗原包被液稀释大熊猫血清,用PBS缓冲液稀释8只小鼠的血清,取大熊猫血清稀释样品各100 μ L包被酶标板的两排即24孔,正常孵育后洗涤甩干,加10%脱脂乳37 $^{\circ}$ C孵育1h后洗涤甩干,每只小鼠血清稀释样品各100 μ L分别加入到3个孔中,充分孵育后洗涤甩干,加酶标二抗孵育,充分洗涤甩干后加酶底物避光显色,再加入终止液终止反应,酶标仪读取OD450值,观察制备的多克隆抗体批内的稳定性。

[0105] 采集试验组小鼠血清保存于4 $^{\circ}$ C,每天重复进行上述试验,共重复试验3次,用酶标仪测定其OD450值。观察随着时间的延长,多克隆抗体批间的稳定性。

[0106] 批内试验时,计算一次试验中每只试验组小鼠3次平衡测定的差异率,最大差异率为4.00%,最小差异率为2.19%。批间重复试验,相同血清3次试验最大差异率为8.33%,最小差异率为2.62%,见表5。

[0107] 表5稳定性测定的三次试验结果

[0108]

OD 值 (OD value)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
第一次试验	1.71	1.70	1.66	1.64	1.70	1.68	1.68	1.70	1.67	1.63	1.53	1.53
(First)	1.68	1.62	1.72	0.25	0.25	0.30	0.24	0.24	0.23	0.26	0.23	0.20
第二次试验	1.77	1.78	1.81	1.71	1.77	1.78	1.72	1.77	1.73	1.69	1.73	1.70
(Second)	1.82	1.86	1.86	0.33	0.28	0.28	0.22	0.22	0.23	0.30	0.32	0.27
第三次试验	1.86	1.81	1.83	1.82	1.82	1.83	1.72	1.71	1.73	1.73	1.62	1.70
(Third)	1.82	1.84	1.82	0.30	0.32	0.30	0.27	0.27	0.27	0.34	0.30	0.30

[0109]

[0110] (2) 多克隆抗体特异性的检测

[0111] 将健康鸡、兔、猪和羊血清,按照大熊猫血清最佳稀释比例1:80进行稀释,按照上述多克隆抗体稳定性的检测操作方法各包被酶标板的两排,正常孵育洗涤甩干,加10%脱脂乳孵育洗涤甩干,每只小鼠血清稀释样品各100 μ L分别加入到3个孔中,充分孵育后洗涤甩干,再加酶标二抗孵育,充分洗涤甩干后加酶底物显色,再加入终止液终止反应,酶标仪读取OD450值。同时,大熊猫血清进行同等倍数的稀释后包被板子作为对照试验,酶标仪读取OD450值。观察鸡、兔、猪、羊、大熊猫各组试验的OD450值,检测多克隆抗体的特异性。

[0112] 如图7所示,取健康鸡、兔、猪和羊血清,按照大熊猫血清最佳稀释倍数包被ELISA酶标板,进行ELISA试验,同时用大熊猫血清作对照,试验结果用GraphPad Prism7软件进行数据间的差异分析,结果显示用小鼠制备的多克隆抗体与大熊猫血清IgG反应性良好,与猪、羊和兔子血清存在交叉反应性,与鸡血清交叉反应微弱。

[0113] 本试验用ELISA方法对制备的多克隆抗体效价、稳定性和特异性进行了检测。为了使检测结果尽可能准确可靠,本专利尽可能地分析了影响ELISA结果的各种因素,比如脱脂乳的浓度,辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG酶标二抗的最佳反应浓度,每步反应的温度和时间等,并且保证使用的酶标二抗、显色液以及终止液等能够正常反应,尽可能减少非特异性结合等因素给试验带来的影响。同时,为了减少非特异性结合,每步孵育结束,多次洗涤和甩干后,再进行下一步操作。

[0114] 为了更加准确的测定制备的多克隆抗体的效价、稳定性以及特异性,重复进行3次试验,减少试验的随机误差。采用批内和批间重复试验发现制备的多抗与大熊猫血清IgG反应性良好,试验差异率较低,多克隆抗体稳定性较好。制备的抗抗体与猪、羊和兔子血清存在交叉反应性,与鸡血清交叉反应微弱。这可能是由于与鸡比较而言,大熊猫和猪、羊及兔子同属于哺乳动物,亲缘关系较近。

[0115] 亲和层析获得平均浓度为265.85 μ g/mL的较纯可溶性重组蛋白免疫健康小鼠,成功制备了效价高、稳定性好的大熊猫多克隆抗体。

[0116] 本文中应用了具体个例对发明构思进行了详细阐述,以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的核心思想。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离该发明构思的前提下,所做的任何显而易见的修改、等同替换或其他改进,均应包含在本发明

的保护范围之内。

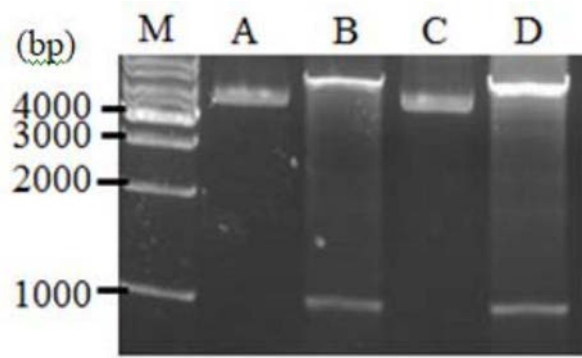


图1

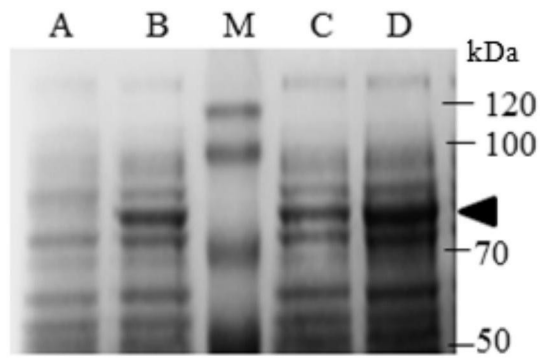


图2

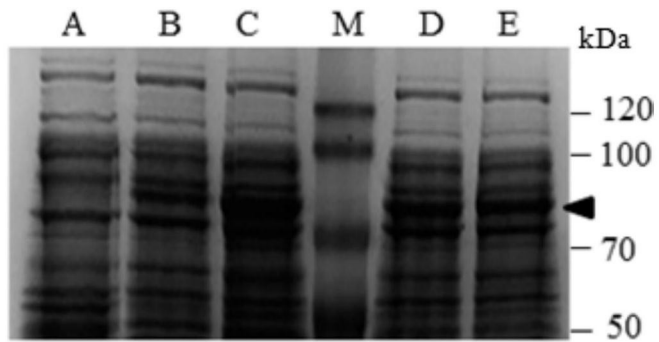


图3

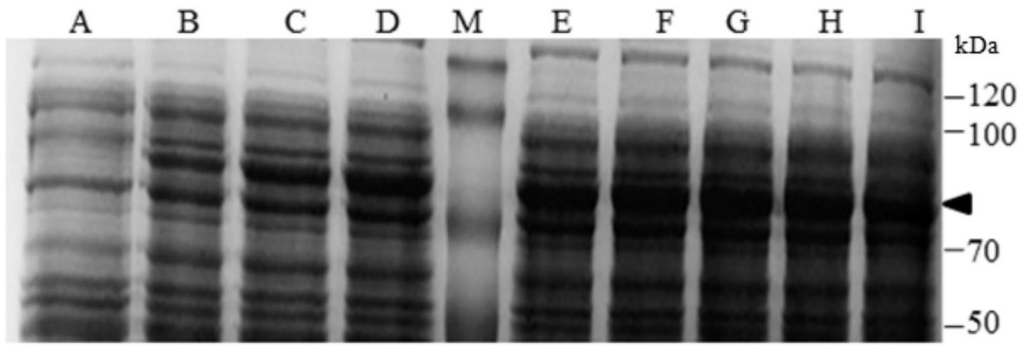


图4

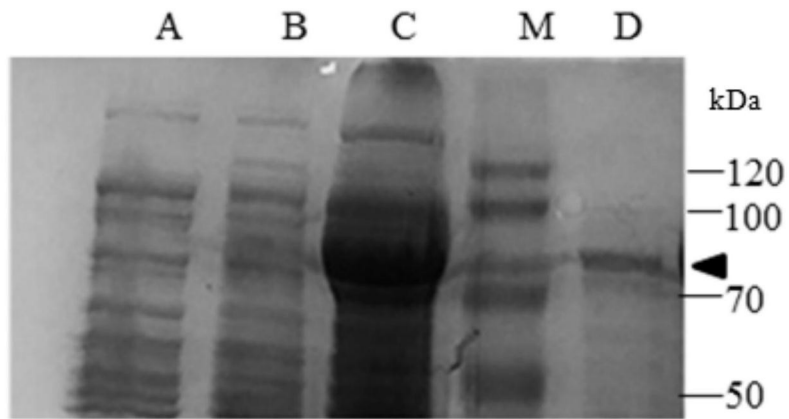


图5

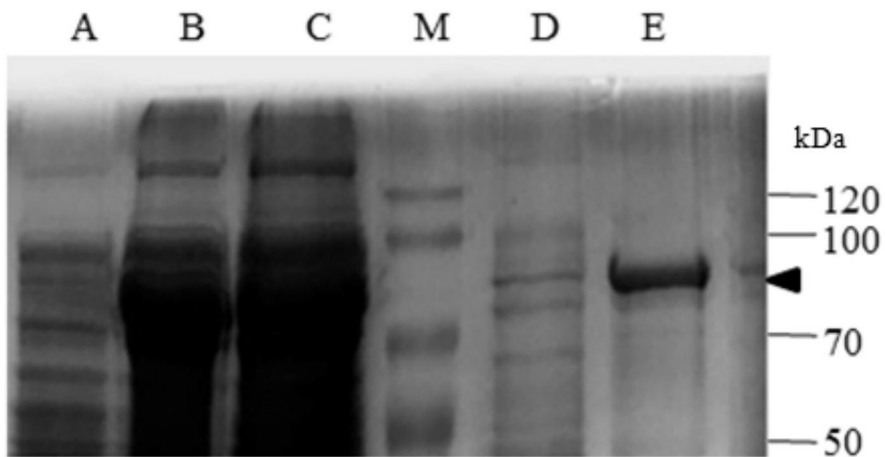


图6

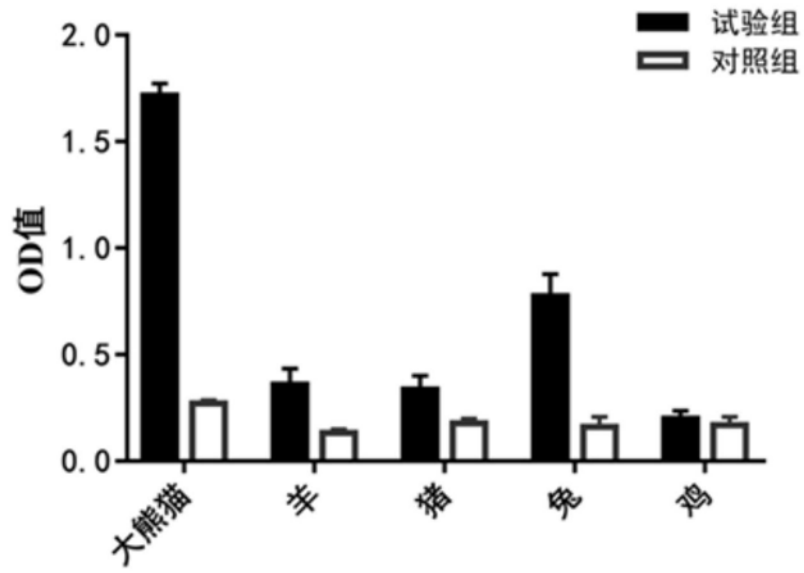


图7