



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102268091 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201110223496. 5

(22) 申请日 2011. 08. 05

(73) 专利权人 中国科学院水生生物研究所
地址 430072 湖北省武汉市武昌区东湖南路
7号

(72) 发明人 戴和平 罗绍祥 陈丛林 张晓华
廖兰杰 汪亚平

(74) 专利代理机构 武汉荆楚联合知识产权代理
有限公司 42215

代理人 王健

Ctenopharyngodon idella”. 《Fish & Shellfish Immunology》. 2010, 第 29 卷 (第 4 期), 第 594 页 - 第 599 页.

丁炜东. “草鱼血清 IgM 蛋白的纯化及抗血清的制备”. 《水生生物学报》. 2010, 第 34 卷 (第 1 期), 第 164 页 - 第 169 页.

李佳. “利用噬菌体展示技术制备识别酵母 RNR3 原核表达片段的单链抗体”. 《武汉大学学报(理学版)》. 2009, 第 55 卷 (第 5 期), 第 563 页 - 第 568 页.

审查员 刘贺

(51) Int. Cl.

C07K 16/42 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

C12P 21/08 (2006. 01)

C12R 1/92 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1733804 A, 2006. 02. 15, 全文.

CN 1318564 A, 2001. 10. 24, 全文.

F. S. Xiao. “Ig heavy chain genes and their locus in grass carp

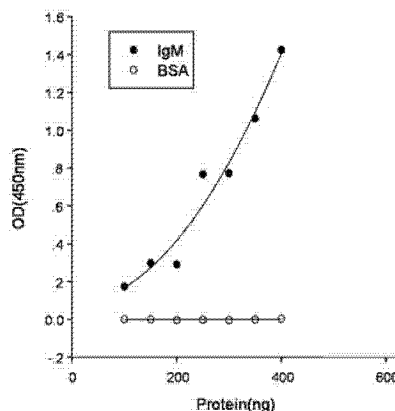
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种能识别草鱼 IgM 的单链抗体 C1B3

(57) 摘要

本发明公开了一种能够识别草鱼 IgM 的单链抗体 C1B3, 并给出了编码单链抗体 C1B3 基因的 DNA 序列及其蛋白质氨基酸预测序列, 涉及水产养殖品种对病原体的免疫响应. 该单链抗体 C1B3 通过噬菌体展示技术制备. 本发明的优点是, 提供一种检测草鱼免疫反应的工具, 减少了检测的成本, 可以针对病原体的感染, 检测草鱼血清中的 IgM 的水平. 附图为 ELISA 对单链抗体 C1B3 与草鱼 IgM 特异性结合的分析图.



1. 一种能识别草鱼 IgM 的单链抗体 C1B3, 其特征在于, 编码单链抗体 C1B3 基因的 DNA 序列如下:

```
GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGATCC
CTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCGATTTTAGTAGATACTGGATGAGTTGGGTCCGGCAGGCTCCAGGGAA
AGGGCTAGAATGGATTGGAGAAATTAATCCAGATAGCAGTACGATAAACTATAACGCATCTCTAAAGGATAAATTCA
TCATCTCCAGAGACAACGCCAAAAATACGCTGTACCTGCAAAATGAGCAAAGTGAGATCTGAGGACACAGCCCTTTAT
TACTGTGCAAGAGAGACGGGGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACCGTGTGACAGGTGGAGG
CGGCTCTGGTGGCGGTGGCAGTGGCGGGCGGAGGTTCTGACGTCGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGA
CTCCAGGAGAAAACAGTCAGTCTTTCCTGTAGGGCCAGCCAGAGTATTTACAAGAACCTACACTGGTATCAACAGAAA
TCACATCGGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGCTTCTGATTCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTCACTGGCAG
TGGATCAGGGACAGATTACACTCTCAGTATCAACAGTGTGAAGCCCGAAGATGAGGGAATATATTACTGTCTTCAAG
GTTACAGCACACCGTACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGTTGAAAATCAAGCGCGCGGCCGCGAGGTGCGCCGGTGCCG
TATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCATAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCTCATAACAGAAAATTCATT
TACTAACGTCTGAAAAGACGACAAAACTTTAG
```

单链抗体 C1B3 的预测氨基酸序列为:

```
MAEVQLLESGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGE INPDSSTINYTPSLKDKFII
SRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCARETGYYFDYWGQGTTLTVSTGGGSGGGGSGGGGSDVVMQSPATLSVTP
GETVLSLSCRASQSIYKNLHWYQQKSHRSPRLLIKYASDSISGIPSRFTGSGSGTDYTLSINSVKPEDEGIYYCLQGY
STPYTFGGGTKLEIKRAAAGAPVPYPDPLEPRAA。
```

一种能识别草鱼 IgM 的单链抗体 C1B3

技术领域

[0001] 本发明涉及水产养殖品种对病原体的免疫响应,具体涉及一种能识别草鱼血清中抗体 IgM 的单链抗体。

背景技术

[0002] 草鱼是我国淡水养殖业重要的养殖品种之一,检测病原体的感染和通过疫苗免疫途径防治病原体的感染,是草鱼高产的重要保障。IgM 存在于大多数真骨鱼类血清中,也存在于草鱼中,是个体发育过程中最早出现的抗体,也是初次体液免疫应答中最早出现的抗体。病原体的感染与 IgM 表达水平具有明显的响应关系,因此检测草鱼血清中 IgM 的水平,可以提示草鱼新近是否发生感染。抗体是研究蛋白表达水平与诱导信号相互关系的有力工具,可应用于研究草鱼对病原体的免疫应答、疫苗效价测定。

[0003] 噬菌体抗体展示技术是近年来出现的一种基因工程抗体表达和筛选的新技术,它是将抗体片段基因通过与噬菌体的外壳蛋白基因融合,而将抗体表达于噬菌体颗粒的表面。由于表达的抗体具有生物活性并可与其相应的抗原相识别,因此可根据抗原抗体结合的特异性进行筛选、富集克隆带有目的抗体的噬菌体。该技术将噬菌体表面表达的抗体的基因型与表现型联系在一起,把抗原抗体结合的特异性同噬菌体的可扩增性联系起来,成为一种高效的筛选体系。由于该技术的宿主细胞是大肠杆菌,因此大大优于依赖于动物的多克隆抗体和依赖于杂交瘤细胞的单克隆抗体的制备过程,使得特异性抗体的筛选和生产更加简便高效,并能大量生产。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种识别草鱼 IgM 的单链抗体 C1B3,该单链抗体 C1B3 通过噬菌体展示技术制备。本发明的优点在于,提供一种检测草鱼免疫反应的工具体,减少了检测的成本,可以针对病原体的感染,检测草鱼血清中的 IgM 的水平。

[0005] 为了达到上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 编码单链抗体 C1B3 基因的 DNA 序列如下:

[0007] GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAGTCTGGAGGTGGCTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAAACTCTCTGTGCAGCCTCAGGATTCGATTTTAGTAGATACTGGATGAGTTGGGTCCGGCAGGCTCCAGGAAAGGGCTAGAAATGGATTGGAGAAATTAATCCAGATAGCAGTACGATAAACTATAACGCCATCTCTAAAGGATAAATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAAAATACGCTGTACCTGCAAATGAGCAAAGTGAGATCTGAGGACACAGCCCTTTATTACTGTGCAAGAGAGACGGGGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACCGTGTGACAGGTGGAGGCGCTCTGGTGGCGGTGGCAGTGGCGGCGAGGTTCTGACGTCGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGAAACAGTCAGTCTTTCTGTAGGGCCAGCCAGAGTATTTACAAGAACCTACACTGGTATCAACAGAAATCACATCGGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGCTTCTGATTCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTACACTCTCAGTATCAACAGTGTGAAGCCGAAGATGAGGGAATATATTACTGTCTTC AAGGTTACAGCACACCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGTTGAAATCAAGCGCGCGGCCGAGGTGCGCCGGTG

CCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCATAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCTCATACAGAAAATTC
ATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTTTAG

[0008] 单链抗体 C1B3 的预测氨基酸序列为：

[0009] MAEVQLLESGLLVQPGGSLKLSAASGFDFSRWMSWVRQAPGKLEWIGEINPDSSTINYTPSLKDK
FITSRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCARETGYYFDYWGQGTTLTVSTGGGGSGGGGSDVVMVTQSPATLS
VTPGETVSLSCRASQSIYKNLHWYQQKSHRSPRLLIKASDSISGIPSRFTGSGSGTDYTLTINSVKPEDEGIYYCL
QGYSTPYTFGGGKLEIKRAAAGAPVPPDPLEPRAA.

[0010] 一种识别草鱼 IgM 的单链抗体 C1B3 的制备方法：

[0011] (1) 从健康小鼠的骨髓干细胞、外周血淋巴细胞和脾脏细胞中提取 mRNA；

[0012] (2) 将得到的 mRNA 反转录为 cDNA, 用对应于重链和轻链抗体可变部位 DNA 的引物, 通过 PCR 技术将抗体的重链和轻链的可变片段的 DNA 扩增；

[0013] (3) 用一编码可弯曲小肽的 DNA 小片段将重链和轻链 DNA 片段连接；组成单链抗体基因, 然后与具同样酶切位点的噬菌体表达载体 Pcantab 5E 连接, 电转移至大肠杆菌 E. coli NM522 中, 获得鼠源天然抗体噬菌体展示 cDNA 文库；

[0014] (4) 进行 10 次电转移, 合并 10 次电转移得到的 cDNA 文库, 该 cDNA 文库的效价为 1.2×10^9 ；

[0015] (5) 从草鱼血清中提取 IgM, 用硫酸铵盐析法和 Protein A 柱层析的方法纯化 IgM, 并将草鱼 IgM 吸附在塑料管壁上；

[0016] (6) 用吸附在塑料壁上的草鱼 IgM 对步骤(4)中得到的效价为 1.2×10^9 的鼠源天然抗体噬菌体展示 cDNA 抗体文库进行三轮淘选, 得到 cDNA 抗体文库的菌液；

[0017] (7) 将菌液涂抹在氨苄抗性的平板上, 37°C 培养至长出单菌落；

[0018] (8) 选取单菌落, 用 ELISA 方法鉴定可特异识别草鱼 IgM 的单链抗体阳性克隆株, 阳性克隆中 OD_{450nm} 值最高的命名为 C1B3 菌株；

[0019] (8) 对 C1B3 菌株进行 DNA 测序；

[0020] (9) 用 C1B3 菌株诱导表达可溶性单链抗体, 该单链抗体即为本发明的一种识别草鱼 IgM 的单链抗体 C1B3。

[0021] 本发明的优点和效果

[0022] 通过噬菌体展示技术得到的单链抗体 C1B3, 可以特异性识别草鱼 IgM。相对于多克隆抗体和杂交瘤制备的单克隆抗体, 本发明的抗体制备过程更为简单, 并可以通过细菌的发酵大量生产, 减少人力物力消耗。利用本发明单链抗体 C1B3 为识别工具, 以草鱼呼肠孤病毒(GCRV)为病原体为例, 感染草鱼, 成功检测到病毒感染后草鱼 IgM 诱导表达水平的变化。其应用前景为: 用草鱼的抗血清为一抗, 以本发明的单链抗体为二抗, 可用于其他各种病原体诱导草鱼 IgM 水平变化的检测, 因此可以将其开发为一种鱼病的免疫学检测试剂盒, 用于草鱼对病原体免疫响应的检测, 以及人工疫苗效价的鉴定。

[0023] 目前未见通过 IgM 水平的变化来检测草鱼对病原体免疫反应的方法, 而针对草鱼人工疫苗的效价鉴定目前只能依赖于哺乳动物的免疫反应检测, 不能精确的反应草鱼自身的免疫反应。本发明的单链抗体 C1B3 的主要优点在于提供了一种检测草鱼免疫反应的工具, 减少了检测的成本, 可以针对病原体的感染, 检测草鱼血清中的 IgM 的水平。

附图说明

[0024] 图 1 为 :ELISA 对单链抗体 C1B3 与草鱼 IgM 特异性结合的分析图。

[0025] 图 2 为 :ELISA 对感染草鱼出血病毒后血清中 IgM 水平变化的分析图。

具体实施方式

[0026] 以下结合附图,对本发明作进一步的说明。

[0027] 一种识别草鱼 IgM 的单链抗体 C1B3 的制备方法 :

[0028] (1) 从健康小鼠的骨髓干细胞、外周血淋巴细胞和脾脏细胞中提取 mRNA ;

[0029] (2) 将得到的 mRNA 反转录为 cDNA,用对应于重链和轻链抗体可变部位 DNA 的引物,通过 PCR 技术将抗体的重链和轻链的可变片段的 DNA 扩增 ;

[0030] (3) 用一编码可弯曲小肽的 DNA 小片段将重链和轻链 DNA 片段连接 ;组成单链抗体基因,然后与具同样酶切位点的噬菌体表达载体 Pcantab 5E 连接,电转移至大肠杆菌 E. coli NM522 中,获得鼠源天然抗体噬菌体展示 cDNA 文库 ;

[0031] (4) 进行 10 次电转移,合并 10 次电转移得到的 cDNA 文库,该 cDNA 文库的效价为 1.2×10^9 ;

[0032] (5) 从草鱼血清中提取 IgM,用硫酸铵盐析法和 Protein A 柱层析的方法纯化 IgM,并将草鱼 IgM 吸附在塑料管壁上 ;

[0033] (6) 用吸附在塑料壁上的草鱼 IgM 对步骤(4)中得到的效价为 1.2×10^9 的鼠源天然抗体噬菌体展示 cDNA 抗体文库进行三轮淘选,得到 cDNA 抗体文库的菌液 ;

[0034] (7) 将菌液涂抹在氨苄抗性的平板上,37℃培养至长出单菌落 ;

[0035] (8) 选取单菌落,用 ELISA 方法鉴定可特异识别草鱼 IgM 的单链抗体阳性克隆株,阳性克隆中 OD_{450nm} 值最高的命名为 C1B3 菌株 ;

[0036] (8) 对 C1B3 菌株进行 DNA 测序 ;

[0037] (9) 用 C1B3 菌株诱导表达可溶性单链抗体,该单链抗体即为本发明的一种识别草鱼 IgM 的单链抗体 C1B3。

[0038] 用一种识别草鱼 IgM 的单链抗体 C1B3 检测草鱼 IgM 的浓度 :

[0039] 一、单链抗体 C1B3 特异性识别草鱼 IgM

[0040] 1a. 将草鱼 IgM 和 BSA (牛血清白蛋白) 分别梯度稀释包被 96 孔板,4℃过夜 ;

[0041] 1b. 倒掉包被的 IgM 溶液和 BSA 溶液,以 4%PBSM (每 100 毫升 PBS 加入 4 克脱脂奶粉溶) 37℃封闭 1 小时 ;

[0042] 1c. 用 PBS 洗 1 次,再加入可溶性单链抗体 C1B3,于 37℃保温 1 小时 ;

[0043] 1d. 用 PBST(0.1 毫升吐温 20 加入 100 毫升 PBS 溶液中) 洗 3 次,再用 PBS 洗 3 次,每孔再加入 100 微升 HRP/Anti E-Tag conjugate (HRP/Anti E-Tag conjugate 用 PBSM 稀释,体积比为 1:10000,HRP/Anti E-Tag conjugate 产品来源于 Amersham Biosciences 公司),37℃保温 1 小时 ;

[0044] 1e. 用 PBST 洗 3 次,再用 PBS 洗 3 次,每孔再加入 100 微升 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Serva 公司) 底物溶液,显色 15 分钟,每孔加入 25 微升 2 摩尔 / 升 H_2SO_4 中止反应,用酶标仪分别测定每孔的 OD_{450nm} 值。

[0045] 若检测所得的 OD_{450nm} 值随 IgM 浓度的增加而增加,且 BSA 测定的结果不随包被浓

度的增加而增加,说明单链抗体 C1B3 能够特异性的识别草鱼 IgM,可以用于对草鱼 IgM 含量的检测。

[0046] 如图 1 所示,单链抗体 C1B3 与实验组草鱼 IgM 的结合随着草鱼 IgM 量的增加而增加,而对照组 BSA 与单链抗体 C1B3 的结合不随浓度的增加而增加,说明本发明的单链抗体 C1B3 与草鱼 IgM 是特异性结合的,可以用于检测草鱼 IgM 的含量。

[0047] 二、用单链抗体 C1B3 检测草鱼出血病病毒诱导的免疫反应

[0048] 2a. 在实验组草鱼的腹腔注射草鱼出血病病毒,在对照组草鱼的腹腔注射生理盐水,每隔 24 小时对抽实验组草鱼和对照组草鱼各取一次血样,共抽取 6 次;

[0049] 2b. 用实验组和对照组的草鱼血清包被 96 孔板,4℃ 过夜;

[0050] 2c. 倒掉包被溶液,以 4%PBSM 37℃ 封闭 1 小时;

[0051] 2d. 用 PBS 洗 1 次,加入可溶性单链抗体 C1B3,于 37 °C 保温 1 小时;

[0052] 2e. 用 PBST 洗 3 次,再用 PBS 洗 3 次,每孔再加入 100 微升 HRP/Anti E-Tag conjugate,37 °C 保温 1 小时;

[0053] 2f. 用 PBST 洗 3 次,再用 PBS 洗 3 次,每孔加入 TMB 底物溶液,显色 15 分钟,每孔加入 2 摩尔 / 升 H_2SO_4 中止反应,酶标仪测定 OD_{450nm} 值。

[0054] 当检测所得的 OD_{450nm} 值显著增加时,说明感染了草鱼出血病病毒的草鱼出现了免疫反应,IgM 水平升高;当草鱼未感染草鱼出血病病毒,或者草鱼感染的草鱼出血病病毒还没有扩增至较高的含量时,没有引发草鱼的免疫反应时,IgM 含量没有变化,检测所得的 OD_{450nm} 值没有显著变化。

[0055] 如图 2 所示,腹腔注射草鱼出血病病毒的实验组草鱼,从第五天开始,血清中 IgM 的含量显著性增加,而对照组草鱼血清中 IgM 的含量一直无显著性差异,说明实验组草鱼在感染了草鱼出血病病毒后第 4 天开始引发免疫反应,IgM 水平开始上升,在第 5 天具有明显的变化,而对照组草鱼 IgM 的水平一直没有显著地变化。该实验证明了单链抗体 C1B3 能够用于草鱼出血病病毒感染后引发的免疫反应的检测。

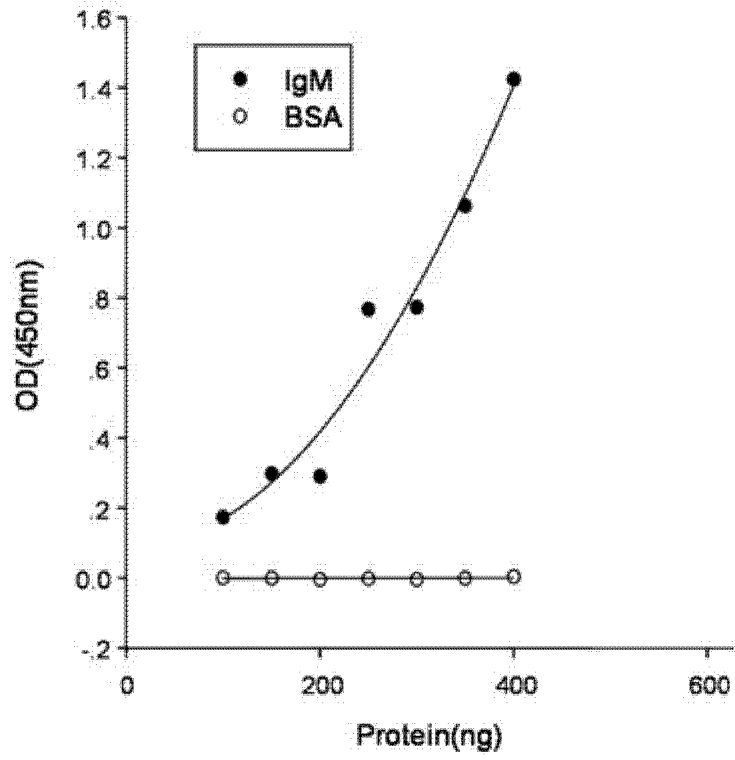


图 1

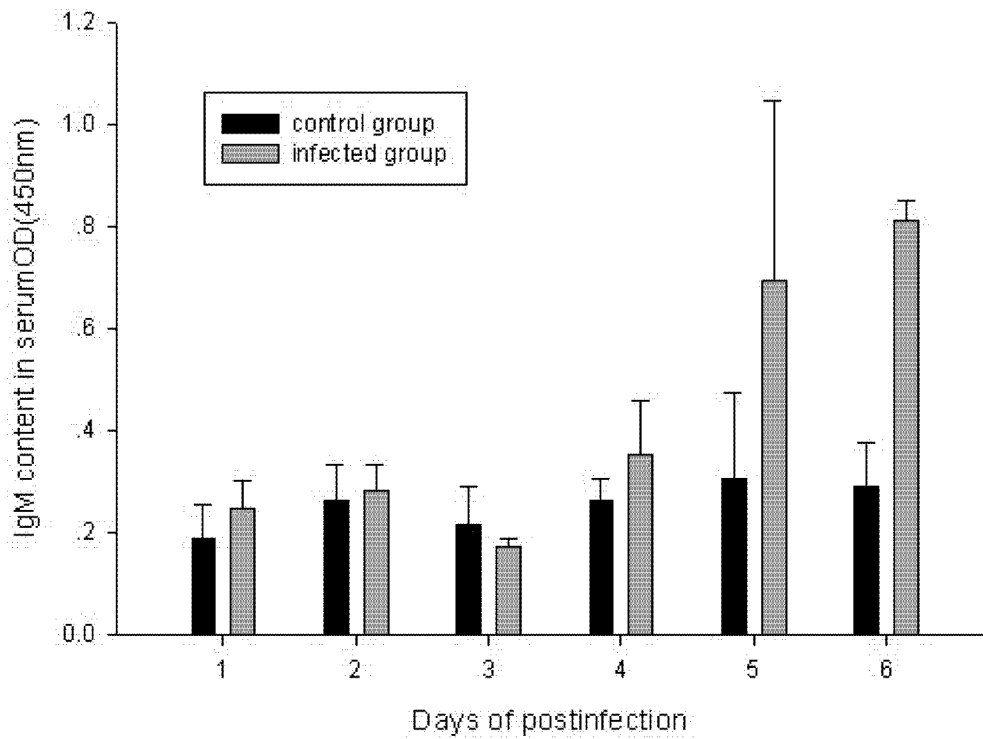


图 2