



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108359007 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201810142380.0

(22)申请日 2018.02.11

(71)申请人 山西农业大学

地址 030801 山西省晋中市太谷县铭贤南路1号

(72)发明人 尹伟 李宏全 范阔海 孙娜  
孙耀贵

(74)专利代理机构 西安铭泽知识产权代理事务所(普通合伙) 61223

代理人 韩晓娟

(51)Int.Cl.

C07K 14/705(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

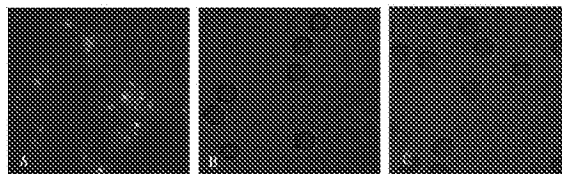
权利要求书1页 说明书8页  
序列表1页 附图3页

### (54)发明名称

猪红细胞ECR1-like膜结合肽段、多克隆抗体、制备方法及应用

### (57)摘要

本发明属于猪红细胞ECR1-like膜结合肽段抗体技术领域,具体涉及一种猪红细胞ECR1-like膜结合肽段、多克隆抗体、制备方法及应用。猪红细胞ECR1-like膜结合肽段的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,为ISANTVILFWFTCLFVQLY,其对应的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,为ata agt gcc aac acg gta atc cta ttc tgg ttt act tgt ctt ttt gtt caa ctatac。本发明成功制备出了具有免疫学活性的猪红细胞ECR1-like膜结合肽段的特异性多克隆抗体,为进一步研究猪ECR1-like分子免疫学功能分子机制提供了研究工具。



1. 一种猪红细胞ECR1-like膜结合肽段,其特征在于,所述猪红细胞ECR1-like膜结合肽段的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,为ISANTVILFWFTCLFVQLY,其对应的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,为ata agt gcc aac acg gta atc cta ttc tgg ttt act tgt ctt ttt gtt caa ctatac。

2. 一种由权利要求1所述的猪红细胞ECR1-like膜结合肽段制成的多克隆抗体。

3. 根据权利要求2所述的多克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1,制备抗原

人工合成SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列,作为抗原;

S2,制备多克隆抗体

S21,制备多克隆抗血清:

取2mL弗氏完全佐剂与2mL的溶于PBS的抗原中,使之乳化,得到抗原乳化液,给家兔注射0.5mL抗原乳化液;两周后,用混溶于弗氏不完全佐剂中的抗原乳化液对家兔进行加强免疫;10d后,家兔心脏采血,收集兔血清,即为多克隆抗血清;

S22,收获多克隆抗血清中的多克隆抗体;

S23,抗体一级纯化:用葡聚糖凝胶A-50对多克隆抗体进行纯化,得到一级纯化抗体;

S24,抗体二级纯化:用对蛋白纯化仪器对一级纯化抗体进行纯化,得到二级纯化抗体,即猪红细胞ECR1-like膜结合肽段多克隆抗体。

4. 一种权利要求1所述的猪红细胞ECR1-like膜结合肽段在制备猪红细胞免疫功能调控试剂中的应用。

5. 一种权利要求2所述的多克隆抗体在制备猪红细胞免疫功能调控试剂中的应用。

## 猪红细胞ECR1-like膜结合肽段、多克隆抗体、制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于猪红细胞ECR1-like膜结合肽段抗体技术领域,具体涉及一种猪红细胞ECR1-like膜结合肽段、多克隆抗体、制备方法及应用。

### 背景技术

[0002] 早期的免疫花环研究测定了大约克夏×长白、金华杂交猪红细胞上C3b受体和免疫复合物花环率,其均值分别为 $8.14 \pm 1.25$ ,  $4.64 \pm 0.84$ ;云南品种猪的红细胞免疫功能,C3bRR率为 $17.2 \pm 4.20$ ,ICR率 $11.2 \pm 3.27$ ,二者相比差异不显著( $P > 0.05$ )。研究学者对西宁地区黑白花奶牛、猪及藏犬红细胞免疫功能做了比较研究,结果证明被测三种动物的红细胞膜上均具有C3bR,其中猪红细胞C3bR花环率为 $4.5 \pm 1.08\%$ 。应用红细胞C3b受体花环(CbRR)和免疫复合物花环(ICR)试验,证实大河猪、迪庆藏猪等猪的细胞表面存在补体受体,C3bRR分别为 $14.87 \pm 2.21$ 和 $21.25 \pm 3.12$ 。由上述研究可见红细胞免疫系统的概念也适用于猪,根据通过计算C3bRR和ICR花环率发现不同品种的猪体内红细胞C3b的数量存在差异,由此推断不同品种的猪体内C3b的分布状态也可能不同。通过对附红细胞体自然感染对猪红细胞的影响研究表明,猪自然感染附红细胞体后,猪红细胞C3bR活性降低,红细胞SOD活性随着感染时间的增加也有所下降,进而抑制了猪红细胞清除免疫复合物、致病原的作用。综上所述,猪红细胞亦具有免疫功能,当猪发生附红细胞体感染后C3bR花环率降低,提示两者可能具有相关性。但总体而言,猪红细胞免疫功能检测指标单一且样本数据有限,因而关于猪红细胞免疫理论的相关机制尚不明确。

[0003] 现有技术中存在的问题是,不清楚猪红细胞ECR1-like中发挥作用的膜结合肽段序列,影响了后续ECR1-like膜分布状态及其对免疫功能的影响等相关问题的深入研究。

### 发明内容

[0004] 本发明提供了一种猪红细胞ECR1-like膜结合肽段、多克隆抗体、制备方法及应用,提供了具体的猪红细胞ECR1-like中发挥作用的膜结合肽段的氨基酸序列,为后续ECR1-like膜分布状态及其对免疫功能的影响等相关问题的深入研究提供了技术工具。

[0005] 本发明提供了一种猪红细胞ECR1-like膜结合肽段,所述猪红细胞ECR1-like膜结合肽段的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,为ISANTVILFWFTCLFVQLY,其对应的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,为ata agt gcc aac acg gta atc cta ttc tgg ttt act tgt ctt ttt gtt caa ctatac。

[0006] 本发明提供了一种由所述的猪红细胞ECR1-like膜结合肽段制成的多克隆抗体。

[0007] 本发明是提供了一种所述的猪红细胞ECR1-like膜结合肽段的多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0008] S1,制备抗原

[0009] 人工合成SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列,作为抗原;

[0010] S2,制备多克隆抗体

[0011] S21,制备多克隆抗血清:

[0012] 取2mL弗氏完全佐剂与2mL的溶于PBS的抗原中,使之乳化,得到抗原乳化液,给家兔注射0.5mL抗原乳化液;两周后,用混溶于弗氏不完全佐剂的抗原乳化液对家兔进行加强免疫;10d后,家兔心脏采血,收集兔血清,即为多克隆抗血清;

[0013] S22,收获多克隆抗血清中的多克隆抗体;

[0014] S23,抗体一级纯化:用葡聚糖凝胶A-50对多克隆抗体进行纯化,得到一级纯化抗体;

[0015] S24,抗体二级纯化:用对蛋白纯化仪器对一级纯化抗体进行纯化,得到二级纯化抗体,即猪红细胞ECR1-like膜结合肽段多克隆抗体。

[0016] 本发明提供了一种所述的猪红细胞ECR1-like膜结合肽段在制备猪红细胞免疫功能调控试剂中的应用。

[0017] 与现有技术相比,本发明提供一种猪红细胞ECR1-like膜结合肽段、多克隆抗体、制备方法及应用,具有以下有益效果:

[0018] 我们在借鉴人类医学研究成果的基础上,以长白猪为研究对象,深入分析了猪红细胞的免疫粘附功能。通过荧光免疫细胞化学染色观测发现猪红细胞能够与致敏的GFP-E.coli结合;以扫描电镜及透射电镜观测发现猪红细胞可与一个或多个新鲜兔血清致敏的GFP-E.coli发生免疫粘附,两者的紧密结合不是由非生物因素所致。

[0019] 本发明提供了一种猪红细胞ECR1-like膜结合肽段,ECR1-like分子稳定发挥免疫粘附功能的重要分子基础,深入分析该序列的生物学信息对于阐述猪红细胞免疫功能调控机制具有科学意义。为能进一步探讨猪红细胞ECR1-like有关的生物学功能,本发明利用兔免疫法制备猪红细胞ECR1-like膜结合肽段的抗血清,并运用酵母真核表达技术体外表达ECR1-like活性膜结合肽段,为后续ECR1-like膜分布状态及其对免疫功能的影响等相关问题的研究奠定技术基础。

## 附图说明

[0020] 图1为TMpred分析结果的447-465区域score值;

[0021] 图2为TMHMM工具分析结果;

[0022] 图3为AKTApurifier纯化多克隆抗体的色谱图;

[0023] 图4为猪红细胞ECR1-like膜结合肽段多克隆抗体的SDS-PAGE检测结果;

[0024] 其中,I、II泳道为猪红细胞ECR1-like膜结合肽段多克隆抗体,M泳道为maker;

[0025] 图5为抗体活性检测结果显微视图;

[0026] 其中图5A是试验A组的结果,图5B是试验B组的结果,图5C是试验C组的结果。

## 具体实施方式

[0027] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明,但不应理解为本发明的限制。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0028] 下述实施例中的实验材料来源如下:

[0029] (1) 实验动物

[0030] 健康长白猪、健康新西兰白兔(太谷县北王村智超养殖场),GFP-E.coli(按常规方法将含有GFP的质粒转入E.coli制得)。

[0031] 巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)菌株X-33、表达质粒pwPICZalpha、大肠杆菌感受态Trans10细胞(E.coli)购自北京全式金生物技术有限公司。

[0032] (2) 主要试剂与耗材

[0033] 抗体制备相关试剂:Dylight488羊抗兔IgG、HRP羊抗兔IgG均购自武汉博士德公司;IgG1同型抗体购自SouthernBiotech;PBSB(0.1mol/L,pH=7.4PBS,10mM的葡萄糖和0.1%的BSA),0.9%NaCl,醋酸缓冲液(60mmol/L,pH=4.0),0.5mol/L NaOH,PB(0.1mol/L pH=6.5),碳酸盐缓冲液(0.5mol/L,pH=9.5),0.1mol/L HCl,蔡氏试剂,PBS(0.1mol/L,pH=7.4);碳酸盐缓冲液(0.5mol/L,pH=9.5),PBS(0.01mol/L,pH=7.4);淋巴细胞分离液(中国医学科学院生物工程研究所研);肝素抗凝管(索莱宝生物试剂公司),淋巴细胞分离液(上海生工生物工程股份有限公司),LB固体培养基(北京康为世纪生物科技有限公司),LB液体培养基(北京康为世纪生物科技有限公司),氨苄青霉素钠(北京康为世纪生物科技有限公司)硫酸氢钾(天津鹏达化学试剂有限公司),碱性品红(天津鹏达化学试剂有限公司),亚硫酸钠(天津鹏达化学试剂有限公司),弗氏完全佐剂(北京索莱宝科技有限公司),辛酸(成都科龙化工试剂厂),硫酸铵(成都科龙化工试剂厂),DEAE-Sephadex A-50(Pharmacia,美国);中性树脂(中国上海标本模型厂),FITC(北京索莱宝科技有限公司,批号:0633);2mL、1.5mL、10mL EP管(北京康为试剂有限公司),96孔不透明板(黑)(北京康为世纪生物科技有限公司),移液器枪头(Thermo scientific公司)

[0034] 真核表达相关试剂:SDS-PAGE制胶试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit凝胶回收试剂盒、E.Z.N.A.TM Plasmid Mini Kit质粒提取试剂盒均购自美国OMEGA公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,50×TAE、高灵敏度化学发光检测试剂盒均自北京康为世纪生物科技有限公司,非还原性蛋白上样Buffer(NuPAGE LDS Sample Buffer(4X))购于美国Life公司,还原性蛋白上样Buffer购于北京索莱宝公司,肽N-糖苷酶F(PNGase-F)购于美国NEB公司,限制性内切酶EcoR I、Xho I、Sac I、T4DNA Ligase、DNA Marker(DL2000)等均购自大连TakaRa公司,Zeocin、琼脂粉购自Invitrogen公司,蛋白胨、酵母浸出粉购于OXOID公司,咪唑、酸水解酪蛋白、盐酸胍、考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液购自北京索莱宝公司,其他试剂均为国产分析纯;离心超滤管(Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-3membrane)购于美国Millipore公司,3.5kD透析袋(Spectra/Por®3)购自美国SPECTRUM公司,阴离子交换树脂(Poros 50 HQ)购于Applied Biosystems公司,Ni-NTA Sefinose™ Resin购自Bio Basic Inc.。

[0035] (3) 主要仪器

[0036] 台式酸度计(pH211,北京哈纳科仪科技有限公司),正置荧光显微镜(BX51TF, Japan),离心机(TDL-50B,上海安亭科学仪器);蛋白纯化仪(AKTApurifier UPC10,GE Healthcare);-86℃超低温冰箱(DW-HL338型,中科美菱);可调式移液器(2.5μL,10μL,20μL,200μL,1000μL;德国Eppendorf公司);电子分析天平(CP225D型,Sartorius公司);超纯水制水机(NW30VF型,Heal Force);立式压力蒸汽灭菌器(LS-100HD型,江阴滨江医疗设备

有限公司);数显恒温水浴锅(HH-S6型,江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);酸度计(PH211型;北京哈纳科仪科技有限公司);恒流蠕动泵(BT100-2J型,保定兰格恒流泵有限公司);层析柱(XK-16型,美国GE公司);基因导入仪(SCIENTZ-2C型,宁波新芝生物科技有限公司);电转杯(165-2086型,美国BIO-ROD公司);高速冷冻离心机(2-16K型,美国Sigma公司);核酸蛋白浓度分析测定仪(ND-1000型,美国NanoDrop公司);琼脂糖水平电泳槽(DYCP-31E型,北京六一仪器厂);PCR仪(MyCycler型,美国Bio-rad公司)琼脂糖凝胶成像系统(JD-801型,江苏捷达科技发展有限公司)生化培养箱(SPX-300-II型,上海跃进医疗器械有限公司)恒温振荡培养器(ZWY-2112B型,上海智城分析仪器制造有限公司);兔保定架。

[0037] 本发明提供的一种猪红细胞ECR1-like膜结合肽段,其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,为ISANTVILFWFTCLFVQLY,其对应的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,为ata agt gcc aac acg gta atc cta ttc tgg ttt act tgt ctt ttt gtt caa ctatac。

[0038] 根据我们前期研究得到的猪红细胞ECR1-like mRNA序列,使用ORF Finder工具根据ECR1-like mRNA翻译氨基酸序列。分别使用TMHMM、TMpred工具分析上述序列,

[0039] 其中,TMpred工具分析结果为:在推测的469个氨基酸残基中,属于膜结合区域的共计9个区域,其中内-外螺旋预测有4段,外-内螺旋预测有5段,根据score 2000趋近原则,显示447-465区域score值最高分别为1884/1579,图1为TMpred分析结果的447-465区域score值,图2为TMHMM工具分析结果,图2中,位于最上方的横线为outside胞外区域,位于中间的曲线为transmembrane,位于最下方接近横坐标的曲线为inside胞内区域,椭圆圈内的柱状区域表示预测概率极高的膜结合区域,分布在447-465区域的氨基酸序列上。

[0040] 其中,TMHMM工具分析发现:结果显示一段区域超过蓝色阈值线(最接近横坐标的线),即从概率上认为447-465区域的氨基酸序列为膜结合区域,图2中椭圆圈指示区域。其余残基分析发现均为胞外游离部位,如图2中箭头所指。结合TMpred预测结果综合分析,选择447-465区域氨基酸序列为目标片段。

[0041] 综合分析并获得猪红细胞ECR1-like的胞外尾区氨基酸序列,应用NCBI 中Protein query vs.translated database(tblastn)工具,推测出猪ECR1-like膜结合肽段为19个残基的短肽,序列为:ISANTVILFWFTCLFVQLY,对应的核苷酸序列为ata agt gcc aac acg gta atc cta ttc tgg ttt act tgt ctt ttt gtt caa ctatac。

[0042] 基于同一种发明构思,本发明还提供了一种猪红细胞ECR1-like膜结合肽段的多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0043] S1,制备抗原:人工合成SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列,作为抗原,具体操作如下:

[0044] 如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列送于北京奥维森基因科技有限公司合成目标短肽作为抗原,备用。

[0045] S2,制备多克隆抗体

[0046] S21,多克隆抗血清制备:取2mL弗氏完全佐剂与2mL的溶于PBS的抗原中,使之乳化,得到抗原乳化液,给家兔注射0.5mL抗原乳化液;两周后,用混溶于弗氏不完全佐剂的抗原乳化液对家兔进行加强免疫;10d后,家兔心脏采血,收集兔血清,即为多克隆抗血清。具体操作如下:

[0047] 取2mL弗氏完全佐剂与2mL的溶于PBS(0.1mol/L,pH=7.4)的抗原中,使之乳化,得

到抗原乳化液。用1mL注射器抽取此抗原乳化液,接上22G针头,排除注射器中的气泡。将家兔放于保定架上,用70%乙醇在后腿肌肉区域进行清洁消毒,进针1cm深注射0.5mL抗原乳化液。两周后,用1mg的混溶于弗氏不完全佐剂的抗原乳化液(将2mL抗原乳化液混溶于2mL弗氏不完全佐剂中)对家兔进行加强免疫,步骤同上。加强免疫10d后,家兔心脏采血20mL。室温下将兔血放置数小时后,于4℃过夜。于4℃下,5000×g离心15min,收集兔血清,即为多克隆抗血清。

[0048] S22,收获多克隆抗血清中的多克隆抗体:多克隆抗血清用醋酸缓冲液(60mmol/L, pH=4.0)4倍稀释,调节pH=4.5。室温下加入辛酸,加入比例为每1mL稀释液中加入30μL辛酸。缓慢搅拌30min。于4℃下10000×g离心30min,取上清。上清液经定性滤纸过滤,加入10倍体积PBS(0.1mol/L, pH=7.4),调pH至7.4,于冰上静置1min。按照每毫升混合液中加0.27g硫酸铵的比例加入硫酸铵,继续搅拌30min。于4℃下,5000×g条件下离心5min,收集沉淀。加2mLPBS溶解蛋白沉淀,将溶液于4℃下15000g离心10min。弃沉淀,上清为多克隆抗体(IgG),收集上清,备用。

[0049] S23,抗体一级纯化:用葡聚糖凝胶A-50对多克隆抗体进行纯化,得到一级纯化抗体,具体操作如下:

[0050] 称取5g DEAE-Sephadex A-50(葡聚糖凝胶A-50),用500mL超纯水进行悬浮,静置1h。倒去上层细小颗粒。加入75mL 0.5mol/L NaOH溶液,搅拌后静置30min,布氏漏斗抽干过滤,用蒸馏水清洗至中性。加入75mL 0.1mol/L HCl,搅拌后静置30min,布氏漏斗抽干过滤,蒸馏水清洗至中性。A-50浸入PB过夜,备用。层析柱固定于滴定管架上,沿玻璃棒倒入0.1mol/L, pH=6.5的PB至1/4柱床高度,将浸泡过的DEAE-Sephadex A-50倒入,待其自然沉降3-4cm时,打开出水夹,继续加入DEAE-Sephadex A-50至所需高度。关闭出水口,待胶柱完全沉降后,于柱面放一层定性滤纸,拧紧柱口盖子,并以塑料管与洗脱液瓶相连。打开出水夹,以两倍柱床体积的0.01mol/L pH=6.5PB平衡柱床,出水速度控制在10-15d/min。检测流出液pH,至流出液与洗脱液pH一致时,关闭出水口。将透析过的蛋白样品沿管壁加在柱床表面,并用少量洗脱液冲洗管壁,加样量为柱床体积的1-2%。打开出水口,待样品完全进入柱床后,以0.1mol/L pH=6.5PB洗脱。以试管收集洗脱部分。将洗脱液上坡段和下坡段收集部分合并,浓缩至所需体积。DEAE-Sephadex A-50经酸碱处理洗净,加入0.02g/100ml NaN<sub>3</sub>, 4℃保存。

[0051] S24,抗体二级纯化:用对蛋白纯化仪器对一级纯化抗体进行纯化,得到二级纯化抗体,即兔抗猪的猪红细胞ECR1-like膜结合肽段多克隆抗体,具体操作如下:

[0052] 应用AKTApurifier中压蛋白纯化仪器对上述一级纯化抗体进行纯化。启动仪器,待其自检完毕后启动中压蛋白纯化系统UNICORN5.31程序,进入软件控制界面。仪器A1管道放入20mM磷酸钠缓冲液(PH=7.0)中,B1管道放入0.1M甘氨酸-盐酸缓冲液(pH=2.7)中,在system control窗口点击工具栏内的manual,选择pump→pump wash purifier,选中A1、B1管道为ON,execute,开始管道及中压泵的清洗。将高压后的1.5mL EP管按顺序安置于Frac900收集器转盘的样品杯槽中,每管中加入1M Tris-HCl (PH=9.0) 15μL。在manual中选择pump→flow rate,输入流速1mL/min,insert;选择Alarm&mon→alarm pressure,设置high alarm 0.3MPa,insert,execute。按照操作规程将纯化柱与上样环1号位管仔细连接,卸掉纯化柱下端堵头,待纯化柱底端滴出液体并将紫外流动池上端口注满后再接入紫外流

动池,使上样缓冲液完全充满柱子,管道及泵。使用上样管将除杂后的腹水缓慢由上样环 Injection Valve的3号位口缓慢推入,以完成上样。全部推入后不取下上样管。件中设置亲和层析柱类型为HiTrap-protein\_G\_HP\_1\_mL,体积为0.962mL;设置柱压力安全范围0.3MPa-0.00MPa,流速设为1mL/min。用缓冲液A平衡管道,平衡液体积数设置为5mL;样品进样体积设置为2mL;将紫外调零,选择Alarm&mon→autozero,体积5mL;样品注入设置为2.5mL,设置Gradient 100 {%B}, 5.00 {base}, 体积12mL。打开B泵,设置Pump wash Basic on,体积12mL;设置流速为(1mL/min),体积为12mL。依次设置Fractionation 900收集体积依次为1mL/管,收集10管后结束收集,设置End Method结束收集程序。按照操作规程常规清洗管道及中压泵,卸下层析柱,整个过程防止气泡干扰,常规关闭仪器。将收集管中的抗体加入超滤离心管中,4℃、4,000r/min,离心1h,加入2mLPBS,4℃、4,000r/min,离心1h后以PBS将纯化后的抗体稀释为2mL,-20℃备用,待测浓度。

[0053] 图3为AKTApurifier纯化多克隆抗体的色谱图,样品开始进入层析柱时紫外流动池监测到穿透峰I,最大峰值为570AU(波长280nm);洗脱缓冲液开始洗脱抗体时紫外流动池监测到洗脱峰II,此时Fractionation\_900收集抗体时开始收集,最大峰值为730AU(波长280nm);洗脱峰回归基线后停止收集。

[0054] S25,抗体浓度测定:完全溶解BSA蛋白标准品,取10μL,用PBS(0.01mol/L,pH=7.4)稀释至250μL,使其终浓度为0.2mg/mL。将5×G250染色液颠倒3-5次混匀,取2mL,加入8mL超纯水,混成1×G250染色液(此染色液可在4℃保存一周)。将稀释后的蛋白标准品按0μL、2μL、4μL、6μL、8μL、12μL、16μL、20μL分别加入到96孔板中,每个梯度浓度做三个重复,不足20μL的孔用PBS(0.01mol/L,pH=7.4)补足到20μL。待测抗体做三个稀释梯度的浓度(1倍稀释,2倍稀释,4倍稀释),每个梯度做三个重复,第一个梯度,每孔加入20μL待测抗体,第二个梯度,每孔加入10μL抗体,第三个梯度,每孔加入5μL抗体,最后不足20μL的用PBS补足。所有孔中都加入稀释后的1×G250,室温放置3-5min。将96孔板放入酶标仪中,混匀震荡3次,设定波长A595,读值。根据测得BSA蛋白标准品的吸光度值绘制标准曲线,算出待测抗体的浓度。法测定纯化后抗体浓度为9.0mg/mL。使用PBS将测定浓度的抗体调整浓度至0.2mg/mL,无菌EP管分装,-80℃备用。

[0055] S26,抗体SDS-PAGE检测:

[0056] 制胶:根据表1配制10%的分离胶,待混匀后立刻灌胶。灌胶后加注一层蒸馏水(可去除气泡和隔绝空气),待蒸馏水和胶中间出现一条折线时,将水缓慢弃去,并使用滤纸将吸干剩余蒸馏水。在制备好的10%的分离胶上面灌注4%的浓缩胶,分离胶和浓缩胶的配方见表1,灌满后迅速插入梳子,该过程应避免气泡的产生。样品与非还原性蛋白上样Buffer(NuPAGE LDS Sample Buffer(4X))5:1比例混匀,准备好样品后使用金属浴95℃变性10min。根据测定的二级纯化抗体浓度计算,每孔上样30μg,20μL。电泳:浓缩胶80V,分离胶120V,溴酚蓝跑至凝胶底部时,停止电泳。按照说明书配制考马斯亮蓝染色液,将凝胶放入平皿中,加入适量考马斯亮蓝染色液,加热至煮沸,30秒后移至水平摇床摇晃并冷却至室温,弃去染色液;加入超纯水漂洗,加热至煮沸,30秒后移至在水平摇床,摇晃并冷却至室温,重复3到4次。扫描凝胶:使用MMAX扫描仪扫描凝胶,采集图像。图4为猪红细胞ECR1-like膜结合肽段多克隆抗体的SDS-PAGE检测结果,I、II泳道为猪红细胞ECR1-like膜结合肽段多克隆抗体,M泳道为maker。图4中可见,抗体电泳结果无杂带,单抗分子量符合理论值



为98kDa。

[0057] 表1分离胶和浓缩胶的配方

	10%分离胶 (10mL)	4%浓缩胶 (6mL)
	超纯水	4.0 mL
	30%Acr/Bis	3.3 mL
[0058]	1.5 mol/L Tris-HCl	2.5 mL
	0.5 mol/L Tris-HCl	不添加
	10%SDS	100 μL
	10%过硫酸铵 (AP)	100 μL
	TEMED	4μL

[0059] S27, 抗体活性检测:

[0060] 对试验猪进行前腔静脉无菌采血,使用猪淋巴细胞分离液分离猪红细胞,2000r/min、5min离心洗涤1次。取管底红细胞,用0.5% IgG-free BSA-Hank' s缓冲液重悬,室温静置15min,1500r/min,5min洗涤1次。加入0.1M甘氨酸-Hank' s,室温静置1h,1500r/min、3min离心洗涤,再以0.5% IgG-free BSA-Hank' s重悬,于普通显微镜下观察红细胞形态并计数,调整红细胞浓度为 $2.47 \times 10^7$ /mL,备用。

[0061] 取3支无菌2ml EP管,依次标记为A组、B组、C组,各组中依次加入上述红细胞悬液190μL、190μL、198μL。A组中,加入10μL二级纯化抗体,使二级纯化抗体浓度为10μg/mL,37℃孵育1h,间歇震荡,用Hank' s缓冲液1500r/min、5min离心洗涤2次,以198μL 0.5% IgG-free BSA-Hank' s重悬。按照说明书建议二级纯化抗体浓度向A组中加入2μL Dylight-488羊抗兔IgG二抗,37℃孵育1h,间歇震荡,孵育全程避光。孵育完毕,用Hank' s缓冲液1500r/min、5min离心洗涤2次,重悬后于荧光显微镜下涂片镜检,采集图像。B组中,作为对照仅加入10μL Hank' s缓冲液,于荧光显微镜下涂片镜检,采集图像。C组中,按照说明书建议浓度加入小鼠IgG1同型抗体(1:200),后期操作同A组,于荧光显微镜下涂片镜检,采集图像。

[0062] 图5为抗体活性检测结果显微视图,其中图5A是试验A组的结果,图5B是试验B组的结果,图5C是试验C组的结果。试验A组红细胞与多克隆抗体孵育后再与Dylight488羊抗兔二抗孵育,荧光显微镜下观察,可见红细胞表面有少量绿色荧光,表明所制备的多抗可与猪红细胞进行特异性的结合(图5A);B组红细胞不与抗体孵育,在荧光显微镜下观察,未发现有荧光点(图5B);C组与IgG1同型抗体孵育,再与Dylight488羊抗兔二抗孵育,在荧光显微镜下观察,未能发现猪红细胞表面存在荧光点(图5C)。

[0063] 上述结果显示,本发明成功制备出了具有免疫学活性的猪红细胞ECR1-like膜结合肽段的特异性多克隆抗体,为进一步研究猪ECR1-like分子免疫学功能分子机制提供了研究工具。

[0064] 需要说明的是,为了防止赘述,本发明的描述了优选的实施例,但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造性概念,则可对这些实施例作出另外的变更和修改。所以,所附权

利要求意欲解释为包括优选实施例以及落入本发明范围的所有变更和修改。

[0065] 显然,本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样,倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

## 序列表

<120> 猪红细胞ECR1-like膜结合肽段、多克隆抗体、制备方法及应用

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Ile Ser Ala Asn Thr Val Ile Leu Phe Trp Phe Thr Cys Leu Phe Val

1

5

10

15

Gln Leu Tyr

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

ataagtgccacacggtaatcctattctggttacttgctttttgttcaactatac57

The sequence positions in brackets denominate the core region. Only scores above 500 are considered significant.

Inside to outside helices : 4 found

from	to	score	center
89 ( 89)	110 ( 109)	421	99
350 ( 358)	377 ( 377)	349	367
383 ( 400)	424 ( 417)	513	409
447 ( 447)	497 ( 465)	1894	455

Outside to inside helices : 8 found

from	to	score	center
120 ( 120)	140 ( 138)	14	130
298 ( 299)	318 ( 315)	41	307
390 ( 390)	408 ( 406)	219	399
410 ( 413)	429 ( 429)	161	421
445 ( 447)	465 ( 465)	1579	455

图1

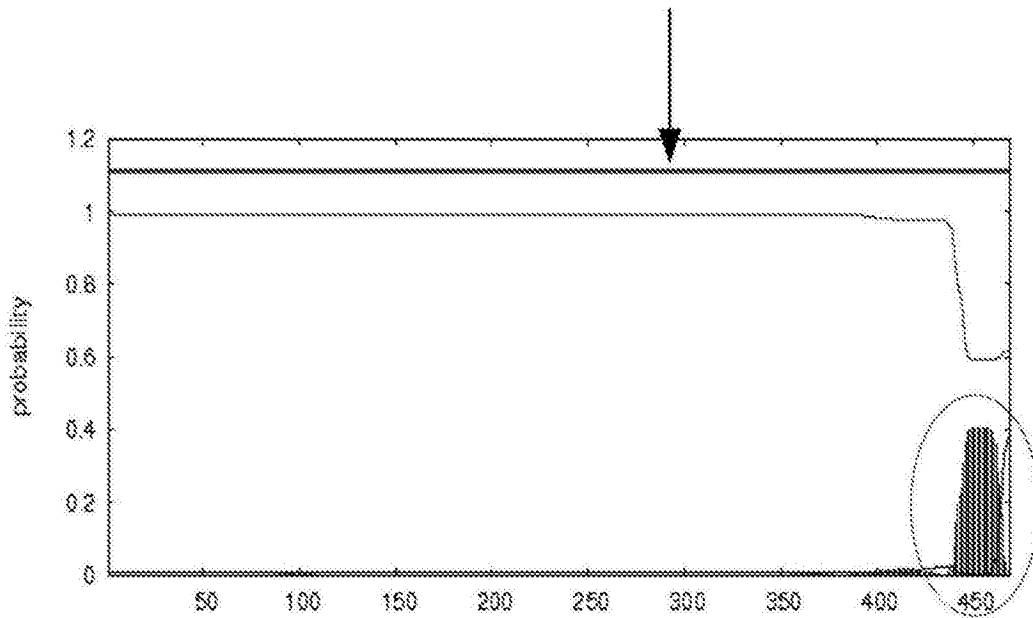


图2

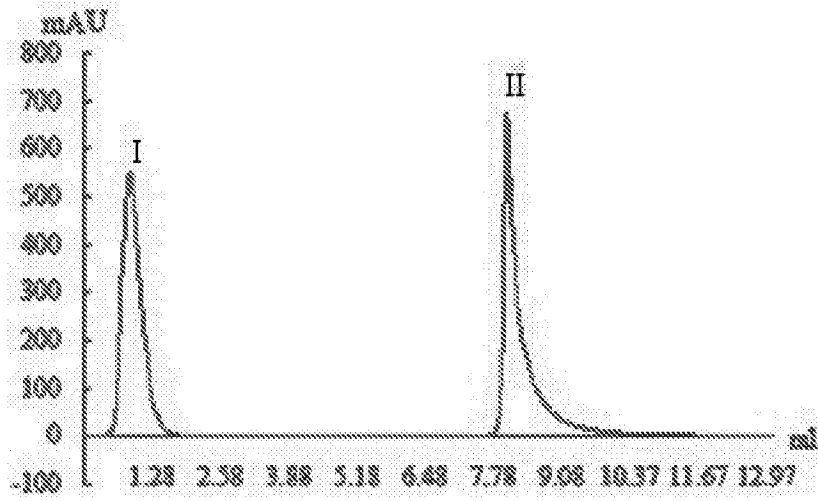


图3

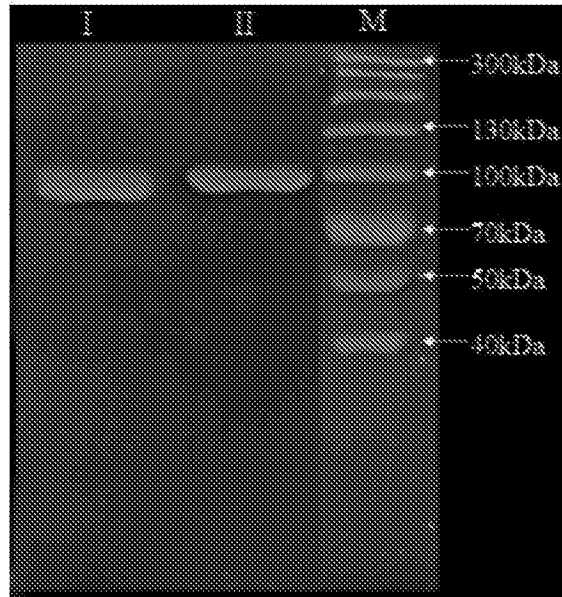


图4

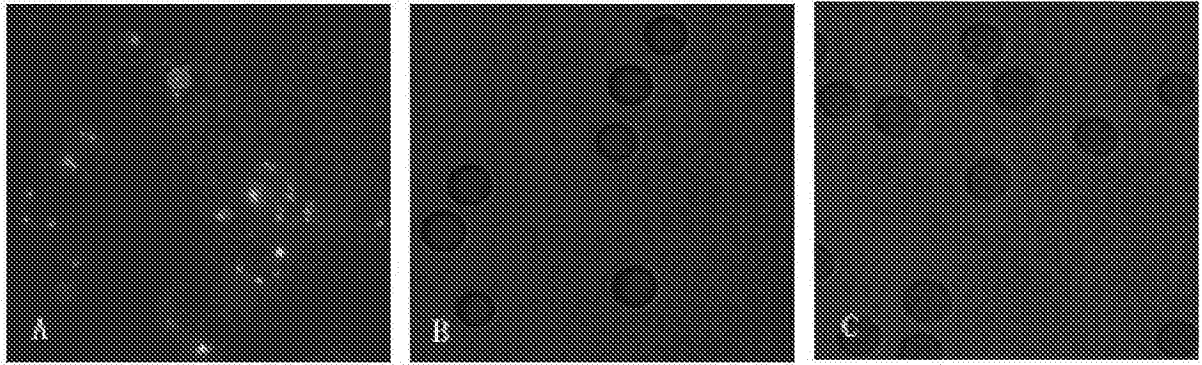


图5