



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111978401 A

(43) 申请公布日 2020.11.24

(21) 申请号 202010799040.2

C12R 1/19 (2006.01)

(22) 申请日 2020.08.11

(71) 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72) 发明人 陶建平 李文静 刘丹丹 程振扬

徐向东 候照峰 许金俊

(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 刘妍妍

(51) Int. Cl.

C07K 16/20 (2006.01)

C07K 14/455 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

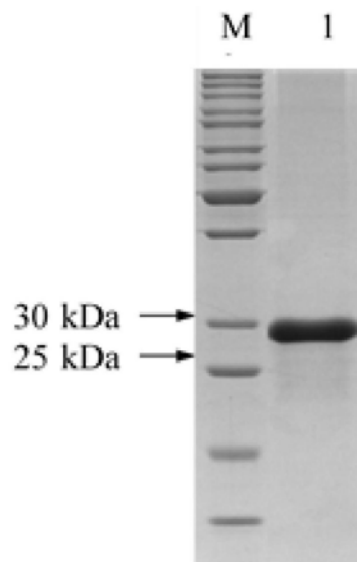
权利要求书1页 说明书6页 附图5页

(54) 发明名称

一种抗毒害艾美耳球虫配子体EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及一种抗毒害艾美耳球虫配子体EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法,包括EnGAM22重组蛋白的制备、动物免疫、杂交瘤细胞的制备和单克隆抗体的制备,EnGAM22重组蛋白免疫小鼠后可产生高效价抗体,制备的杂交瘤细胞株可稳定分泌高性能抗EnGAM22蛋白单克隆抗体。本发明还公开了一种抗毒害艾美耳球虫配子体EnGAM22蛋白单克隆抗体,亚型分别为IgG2a、IgG2b,结合能力强、特异性好、效价高。本发明还公开了EnGAM22蛋白在毒害艾美耳球虫虫体中的定位,特异性强,准确性好。



1. 一种抗EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将重组菌株pET28a(+)-Engam22/BL21在含有IPTG的LB培养基中诱导培养,超声破碎菌体后将上清用Ni-NTA亲和纯化层析柱纯化并透析复性得到EnGAM22重组蛋白;

采用EnGAM22重组蛋白注射小鼠体内进行免疫,选择血清抗体效价达到评价标准的小鼠作为免疫小鼠;

对所述免疫小鼠注射不加佐剂的EnGAM22重组蛋白,取脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0进行细胞融合,经选择性培养后,再进行多次亚克隆,最终得到能稳定分泌特异性抗EnGAM22蛋白抗体的杂交瘤细胞;

对BALB/c雌性小鼠注射腹水专用佐剂,腹腔注射杂交瘤细胞,抽取腹水并纯化得到抗EnGAM22蛋白单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于,小鼠免疫的方法为:用浓度为1.8mg/mL的EnGAM22重组蛋白与等体积的Quick Antibody-Mouse 3W混合进行腿部肌肉注射;第二周进行二次免疫;第三周眼眶后静脉丛采血测定血清抗体效价。

3. 根据权利要求1所述的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于,杂交瘤细胞的制备方法为:对所述免疫小鼠腿部肌肉注射不加佐剂的EnGAM22重组蛋白,三天后取脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0进行细胞融合,经选择性培养后,再进行三次亚克隆,最终得到能稳定分泌特异性抗EnGAM22蛋白抗体的杂交瘤细胞。

4. 根据权利要求1所述的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于,单克隆抗体的制备:选取10-12周龄的BALB/c雌性小鼠注射腹水专用佐剂,两周后腹腔注射杂交瘤细胞,7d后抽取腹水并纯化得到抗EnGAM22蛋白单克隆抗体;注射杂交瘤细胞的浓度为 $1 \times 10^6$ 个细胞/只。

5. 根据权利要求1所述的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述重组菌株pET28a(+)-Engam22/BL21在含有IPTG的LB培养基中37°C诱导培养4-6h。

6. 根据权利要求1所述的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述免疫小鼠的血清抗体效价的评价标准为大于1:10 000。

7. 根据权利要求1所述的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于,小鼠骨髓瘤细胞SP2/0与脾细胞悬浮液的体积比为1:10。

8. 根据权利要求1所述的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于,抗EnGAM22蛋白单克隆抗体的纯化方法为Protein G亲和层析法。

9. 一种抗EnGAM22单克隆抗体,其特征在于,由权利要求1-8任一项所述的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法制备而成。

10. 如权利要求9所述的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体用于定位EnGAM22蛋白在毒害艾美耳球虫虫体各阶段表达情况的应用,其特征在于,包括以下步骤:

将毒害艾美耳球虫配子体、未孢子化卵囊用PBS稀释涂于载玻上,预冷的甲醇作用10min后洗涤,用0.1%Triton X室温作用10min,10%山羊血清湿盒内37°C过夜封闭,一抗为杂交瘤细胞上清,湿盒内37°C孵育1h,二抗为FITC标记的羊抗鼠IgG,用10%山羊血清1:100倍稀释,湿盒内37°C孵育1h,滴加抗荧光淬灭液封片,荧光显微镜观察结果。

## 一种抗毒害艾美耳球虫配子体EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种抗毒害艾美耳球虫配子体 EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 鸡球虫病(Coccidiosis)是集约化鸡场最常见的禽病之一,给养鸡业造成巨大的经济损失。毒害艾美耳球虫(*Eimeria necatrix*)是鸡球虫病的主要病原之一,寄生于鸡的小肠中段,引起鸡的急性小肠球虫病,主要危害8~18周龄的青年鸡。近年来随着鸡球虫病活疫苗的推广应用,以及黄羽鸡饲养周期相对较长且常采用地面放养或圈养,使得毒害艾美耳球虫引起的急性小肠球虫病越来越多见。因此,迫切需要对该球虫的生物学与分子生物学进行深入研究,发现药物或免疫治疗靶点、或疫苗候选抗原。

[0003] 卵囊是球虫类寄生虫在宿主间传播的重要发育阶段,是由球虫在配子生殖时受精后的大配子发育而成,其囊壁是由位于球虫大配子体成壁体中的蛋白形成,但配子体蛋白形成卵囊壁的分子机制尚不清楚。单克隆抗体具有很高的特异性和灵敏性,与免疫荧光、免疫电镜等技术结合可将目的抗原定位在虫体,是研究寄生虫虫体细微结构和发育分子机制的重要检测试剂,对于寄生虫病的免疫治疗与机理研究也具有重大意义。迄今,有关毒害艾美耳球虫卵囊壁蛋白单克隆抗体的研制与应用尚未见有报道。为此,本专利制备的抗毒害艾美耳球虫配子体蛋白的单抗,可用于研究球虫卵囊壁形成的分子机制以及配子体蛋白的功能,解析球虫配子体蛋白亚单位疫苗的免疫保护机制等。

### 发明内容

[0004] 为了克服现有技术不足,本发明目的之一在于提供一种抗毒害艾美耳球虫配子体EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法,本方法用纯化后的高浓度蛋白与一种新型的佐剂混合免疫小鼠可以产生高效价的抗体,制备的杂交瘤细胞株可持续分泌高性能的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体。

[0005] 本发明目的之二在于提供一种抗毒害艾美耳球虫配子体EnGAM22蛋白单克隆抗体,由上述方法制备,亚型分别为IgG2a、IgG2b,抗体的特异性好,效价高。

[0006] 本发明目的之三在于提供一种上述单克隆抗体鉴定EnGAM22蛋白在毒害艾美耳球虫虫体表达情况的应用。

[0007] 本发明的目的之一采用如下技术方案实现:

[0008] 一种抗EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0009] 将重组菌株pET28a(+)-Engam22/BL21在含有IPTG的LB培养基中诱导培养,超声破碎菌体后将上清用Ni-NTA亲和纯化层析柱纯化并透析复性得到 EnGAM22重组蛋白;

[0010] 采用EnGAM22重组蛋白注射小鼠体内进行免疫,选择血清抗体效价达到评价标准的小鼠作为免疫小鼠;

[0011] 对所述免疫小鼠注射不加佐剂的EnGAM22重组蛋白,取脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0进行细胞融合,经选择性培养后,再进行多次亚克隆,最终得到能稳定分泌特异性抗EnGAM22蛋白抗体的杂交瘤细胞;

[0012] 对BALB/c雌性小鼠注射腹水专用佐剂,腹腔注射杂交瘤细胞,抽取腹水并纯化得到抗EnGAM22蛋白单克隆抗体。

[0013] 一种抗EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0014] EnGAM22重组蛋白的制备:将重组菌株pET28a(+)-Engam22/BL21在含有IPTG的LB培养基中37℃诱导培养4-6h,超声破碎后收集上清用Ni-NTA亲和纯化层析柱纯化并透析复性得到高浓度的EnGAM22重组蛋白。

[0015] 动物免疫:将浓度为1.8mg/mL的所述EnGAM22重组蛋白与等体积的Quick Antibody-Mouse 3W混合进行腿部肌肉注射;第二周进行二次免疫,免疫方式、剂量与体积同前。第三周眼眶后静脉丛采血,选择血清抗体效价1:51 200的小鼠作为免疫小鼠;

[0016] 杂交瘤细胞的制备:对所述免疫小鼠腿部肌肉注射不加佐剂的EnGAM22重组蛋白,三天后提取脾脏细胞,小鼠骨髓瘤细胞SP2/0与脾细胞悬浮液的体积比为1:10进行细胞融合,经选择性培养后,再进行三次亚克隆,即能得到稳定分泌特异性抗EnGAM22蛋白抗体的杂交瘤细胞株;

[0017] 单克隆抗体的制备:选取10-12周龄的BALB/c小鼠注射腹水专用佐剂,两周后腹腔注射杂交瘤细胞,约 $1 \times 10^6$ 个细胞/只,7d后抽取腹水用Protein G亲和层析法纯化得到抗EnGAM22蛋白单克隆抗体。

[0018] 本发明的目的之二采用如下技术方案实现:

[0019] 一种抗EnGAM22蛋白单克隆抗体,由上述的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体的制备方法制备而成。

[0020] 进一步地,所述抗EnGAM22蛋白单克隆抗体亚型分别为IgG2a、IgG2b。

[0021] 本发明的目的之三采用如下技术方案实现:

[0022] 利用免疫组化实验将EnGAM22蛋白单克隆抗体用于鉴定EnGAM22蛋白在虫体各阶段表达情况的应用。

[0023] 将毒害艾美耳球虫配子体、未孢子化卵囊用PBS稀释涂于载玻上(显微镜下看到少量配子体即可);用提前预冷的甲醇作用10min,PBST洗涤3次,5min/次;0.1%Triton X室温作用10min,PBST洗涤3次,5min/次;10%山羊血清封闭,湿盒内37℃过夜封闭;一抗为杂交瘤细胞上清,湿盒内37℃孵育1h,PBST洗涤3次,5min/次;二抗为FITC标记的羊抗鼠IgG,用10%山羊血清1:100倍稀释,湿盒内37℃孵育1h,PBST洗涤3次,5min/次;滴加抗荧光淬灭液封片,荧光显微镜观察结果。

[0024] 本发明与背景技术相比,有益性在于:

[0025] 在制备本发明的单克隆抗体过程中,使用的Quick Antibody-Mouse 3W免疫佐剂相比于传统的弗式佐剂,为水溶性佐剂不需要乳化,具有免疫针次少,抗体生产快,抗体滴度高,不破坏抗原天然构象等特点。本发明得到的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体2F3为IgG2a亚型,3D3单克隆抗体为IgG2b亚型,具有特异性高,可大量生产的特点,所得抗体腹水效价达到1:4 096 000。本发明得到的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体能够特异性结合EnGAM22重组蛋白、毒害艾美耳球虫EnGAM22天然蛋白,而不识别柔嫩艾美耳球虫、堆型艾美耳球虫、巨型

艾美耳球虫的配子体蛋白。与抗EnGAM22蛋白多克隆抗体相比,本发明得到的抗EnGAM22蛋白单克隆抗体能更精确地定位EnGAM22蛋白在毒害艾美耳球虫成壁体及卵囊壁上的位置,从而追溯EnGAM22蛋白从成壁体至卵囊壁的转运过程,解析卵囊壁的分子形成机制。

### 附图说明

[0026] 图1为实施例1中纯化后的EnGAM22重组蛋白SDS-PAGE电泳图;M、蛋白Marker;1、纯化后的EnGAM22重组蛋白;

[0027] 图2为实施例3中的小鼠血清抗体效价图;

[0028] 图3为实施例6中的腹水单克隆抗体纯化后效果图;1、2F3单克隆抗体腹水纯化效果;M、蛋白Marker;2、3D3单克隆抗体腹水纯化效果;

[0029] 图4、图5为实施例9中的单克隆抗体特异性鉴定EnGAM22重组蛋白 Western-blot图;M、蛋白Marker;1、EnGAM22重组蛋白;2、HIS标签蛋白;

[0030] 图6、图7为实施例9中的单克隆抗体特异性鉴定毒害艾美耳球虫天然配子体蛋白 Western-blot图;M、蛋白Marker;1、毒害艾美耳球虫天然配子体蛋白;

[0031] 图8、图9为实施例9中的单克隆抗体特异性鉴定柔嫩艾美耳球虫、堆型艾美耳球虫以及巨型艾美耳球虫天然配子体蛋白Western-blot图;M、蛋白Marker;1、柔嫩艾美耳球虫天然配子体蛋白;2、堆型艾美耳球虫天然配子体蛋白;3、巨型艾美耳球虫天然配子体蛋白;

[0032] 图10为实施例10中的单克隆抗体特异性鉴定毒害艾美耳球虫配子体、未孢子化卵囊IFA图。U0代表未孢子化卵囊,GAM代表配子体;A-D为虫体自发荧光;E-H为抗体的免疫荧光定位结果,其中E、F为2F3单抗的免疫荧光定位结果,G为3D3单抗的免疫荧光定位结果,H为小鼠阴性血清对照;I- L为光镜下虫体的观察。

### 具体实施方式

[0033] 以下结合实施案例来进一步解释本发明,其他技术人员可以参考并适当任意组合形成新的实施。

[0034] 实施例1:EnGAM22重组蛋白的诱导表达与纯化复性

[0035] 将本研究室构建保存的pET28a (+)-Engam22/BL21,接种到4mL LB培养液中(含100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素),200rpm振荡培养37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,按1:100转接 500mL含相同浓度抗生素LB中,200rpm振荡37 $^{\circ}\text{C}$ 培养2h,加入终浓度为1 mM的IPTG诱导4h。取诱导菌500mL,PBS洗涤离心收集菌体,重悬于10mL PBS中,冰浴超声裂解,释放包涵体;4 $^{\circ}\text{C}$  12 000rpm离心15min,弃去上清,将沉淀中加入10mL LE Buffer(100mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,10mM Tris  $\cdot$  Cl,8M urea,pH 8.0),冰浴超声加速包涵体溶解;4 $^{\circ}\text{C}$  12 000rpm离心15min,将上清转移到含有6 $\times$ HIS标签Ni-NTA亲和纯化层析柱中,4 $^{\circ}\text{C}$ 结合60min,期间不断摇晃,使目的蛋白与层析柱充分结合;用Washing Buffer(100mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,10mM Tris  $\cdot$  Cl,10mM Imidazole,8M urea,pH 8.0)洗涤层析柱,重复5次;用Elution Buffer(100mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,10mM Tris  $\cdot$  Cl,500mM Imidazole,8M urea,pH 8.0)洗脱蛋白,重复5次;收集洗脱液,A280紫外光吸收法测定蛋白浓度。将收集到的洗脱液转移到透析袋中,分别在含有6M、4M、2M、1M尿素的透析液(1%Glycine,50mM Tris,0.5mM EDTA,50mM NaCl,5%Glycerine,pH 8.0)和0.1M PBS中4 $^{\circ}\text{C}$ 复性6-8h,最终PEG8000浓缩,收集蛋白,A280紫外光吸收法测定蛋白的浓度。经SDS-PAGE检测EnGAM22重组蛋白的

纯化情况,结果如图1泳道2所示,在约29kDa处有一单一条带,可用于免疫小鼠。

[0036] 实施例2:动物免疫

[0037] 取6-8周龄的BALB/c小鼠,用浓度为1.8mg/mL的EnGAM22重组蛋白与等体积的Quick Antibody-Mouse 3W混合进行首次免疫,20 $\mu$ g/只,100 $\mu$ L/只,腿部肌肉注射;首免后第二周进行二次免疫,免疫方式、剂量与体积同前。第三周眼眶后静脉丛采血建立ELISA方法以及检测小鼠血清抗体效价,测定的血清抗体效价1:10 000以上认定为合格,合格后用不加Quick Antibody-Mouse 3W 的蛋白进行加强免疫。

[0038] 实施例3:ELISA方法的建立以及小鼠血清抗体效价的测定

[0039] 采用方阵滴定法确定EnGAM22重组蛋白的最佳包被浓度以及小鼠血清抗体效价。

[0040] EnGAM22重组蛋白用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)从4 $\mu$ g/mL倍比稀释到0.125  $\mu$ g/mL,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜后,弃掉包被液,用PBST洗三次,5min/次,拍干后加入1%BSA,200 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭2h,PBST洗三次,5min/次,拍干;用PBS将待检血清以及阴性血清从

[0041] 1:200倍比稀释到1:51 200,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h;PBST洗三次,5 min/次,拍干;用PBS将HRP标记的羊抗鼠IgG稀释20 000倍(推荐倍数),100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h;PBST洗5次,5min/次,拍干;加入TMB 显色液,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C避光作用15min;立即加入2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,50 $\mu$ L/孔,终止反应,用酶标仪检测OD<sub>450</sub>值。

[0042] P为待检血清OD<sub>450</sub>值,N为阴性血清OD<sub>450</sub>值,选择P值接近于1.0,N 值接近于0.1,且P/N值最大时的待检孔的抗原包被浓度为最佳包被浓度。本发明经过实施例3最终确定EnGAM22重组蛋白的最佳包被浓度为0.125 $\mu$ g/mL,小鼠的血清抗体效价达1:51 200,结果如图2所示。

[0043] 实施例4:杂交瘤细胞株的建立

[0044] 取一只8-12周龄的ICR小鼠脱颈处死消毒5-10min,剪开小鼠腹部皮肤,用无菌注射器抽取5mL提前准备好的1%HAT-20%FBS-DMEM培养基推注到小鼠腹腔内,轻轻按摩腹部后,用注射器将混有饲养层细胞的培养基抽出至95 mL 1%HAT培养基中备用。

[0045] 第三天取加强免疫的BALB/c小鼠,脱颈处死后于75%的酒精中浸泡5-10 min。将小鼠四肢固定在解剖台上,用无菌的剪刀、镊子取出脾脏,去除脾脏表面附着的脂肪和结缔组织,用无菌注射器针头反复穿刺脾脏并挤压使脾细胞释放,收集脾细胞悬液置于50mL离心管内37 $^{\circ}$ C静置10min后取上清。将小鼠骨髓瘤细胞SP2/0与脾细胞悬浮液的体积比为1:10混匀,800rpm离心8min,弃上清后,用手掌心轻柔地将沉淀散开混匀,在1min以内边转动离心管边加入提前预热至37 $^{\circ}$ C的1mL PEG1500,速度由慢变快,静置1min后,90s内沿着管壁加入25mL提前预热至37 $^{\circ}$ C的DMEM培养基终止融合,速度由慢变快。在37 $^{\circ}$ C培养箱中静置10min,800rpm离心8min,弃上清。将含有饲养层细胞、SP2/0细胞、脾细胞混匀后的100mL 1%HAT培养基滴加至96孔细胞培养板,中间两滴,外周三滴,置于5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C培养。5d后用1%HAT 培养基对细胞进行半换液,10d后用1%HT-20%FBS-DMEM培养基进行全换液。待培养板中的细胞长至底面积的1/3时,吸取细胞培养上清,用建立好的 ELISA方法进行阳性杂交瘤细胞的筛选,三次筛选后,挑选ELISA读值均阳性的细胞孔进行扩大培养并亚克隆。

[0046] 采用有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行亚克隆,用建立好的ELISA方法进行筛选。1mL 1%HT培养基将生长状态良好的阳性杂交瘤细胞吹打混匀后在显微镜下计数并取出80

个细胞,加置10mL 1%HT培养基中,吹打混匀后滴加到 96孔培养板内,2滴/孔,置于5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中37℃培养,第5d标记单克隆团数,第10d对单克隆细胞用建立好的ELISA方法进行筛选,将第一次亚克隆阳性的单克隆细胞进行二次亚克隆,直至筛选出的亚克隆细胞全部是阳性、单克隆时定株,最终得到两株能稳定分泌单抗的杂交瘤细胞株2F3、3D3,并及时将该细胞扩大培养、冻存。

[0047] 实施例5:单克隆抗体腹水制备

[0048] 挑选10-12周龄的BALB/c小鼠,提前两周注射0.4mL腹水专用佐剂(货号为KX0210048-10,购自北京博奥龙免疫技术有限公司),将杂交瘤细胞用无抗无血DMEM培养基稀释并计数,调整细胞密度,约 $1 \times 10^6$ 个细胞,0.5mL/只。接种后第7d,小鼠腹部变大,被毛杂乱,行动迟缓。酒精棉球消毒腹部后,用无菌的5mL注射器针头抽取小鼠腹水,3 500rpm离心10min,弃去表面油脂,-80℃保存备用。2d后,用同样方法抽取小鼠腹水,直至小鼠死亡。

[0049] 实施例6:单克隆抗体腹水纯化

[0050] 用Protein G亲和层析柱介质纯化腹水,将抽取的腹水样品用Binding/Wash Buffer (20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.15M NaCl,pH 8.0) 1:1稀释,将腹水样品倒入装有树脂的层析柱中,以1mL/min的流速收集流出液,用30mL Binding/Wash Buffer洗涤树脂,流速保持在2mL/min,再用15mL Elution Buffer (0.1M甘氨酸,pH 2.5)洗脱抗体,流速维持在1mL/min,将收集到的含有目的免疫球蛋白的洗脱液中加入1/10洗脱液体积的中和Buffer (1M Tris-HCl,pH 8.5),调节pH至7.4,-80℃保存备用。经SDS-PAGE电泳鉴定EnGAM22单克隆抗体的纯度。结果如图3所示,图中可见两条清晰的条带,其中50kDa为2F3、3D3 单抗的重链,25kDa为其轻链。

[0051] 实施例7:单克隆抗体效价测定

[0052] 以EnGAM22重组蛋白为包被原,利用建立好的ELISA方法进行杂交瘤细胞上清以及小鼠腹水的血清抗体效价检测。设置阴、阳性小鼠血清对照孔,杂交瘤细胞上清用PBS从1:100开始倍比稀释,腹水首孔用PBS从1:1 000开始倍比稀释。本发明经过实施例7最终得出2F3单克隆抗体的细胞上清效价为1 :12 800,纯化前腹水效价为1:4 096 000,纯化后腹水效价为1:256 000。3D3 单克隆抗体的细胞上清效价为1:3 200,纯化前腹水效价1:1 024 000,纯化后腹水效价为1:64 000。

[0053] 实施例8:单克隆抗体亚型鉴定

[0054] 杂交瘤细胞的亚型鉴定用的是北京博奥龙免疫技术有限公司的酶标二抗即用套装,本套装含有Goat Anti-Mouse Ig (G1/G2a/G2b/G3/M/A)-HRP 6种酶标二抗。以EnGAM22重组蛋白为包被原,每孔100μL合100ng,4℃放置过夜后,甩干包被液用PBST洗一次,5min/次;将待测杂交瘤细胞培养上清每种加一排共计6孔,每孔100μL,置37℃温育30min,甩去包被液用PBST洗5次,5min/次;将6种酶标记物每种加1孔,100μL/孔,37℃温育30min,甩去包被液用 PBST洗5次,5min/次;随后加TMB显色液37℃避光显色20min,即可判定结果。肉眼观察兰色孔即为阳性,此孔对应的酶标二抗就为此株单抗的Ig类别。本发明经过实施例8最终得出2F3单克隆抗体为IgG2a亚型,3D3单克隆抗体为IgG2b亚型。

[0055] 实施例9:Western-blot鉴定单克隆抗体的特异性

[0056] 取EnGAM22重组蛋白,超声破碎后的毒害艾美耳球虫、柔嫩艾美耳球虫、堆型艾美耳球虫以及巨型艾美耳球虫配子体蛋白样品加入6×上样缓冲液混匀,电磁炉沸水煮10-

15min,12 000rpm离心5min,取样品上清加入泳道进行 SDS-PAGE并转印到硝酸纤维素膜上,转印结束后置于3%BSA中4℃过夜封闭,杂交瘤细胞上清原液为一抗,室温孵育50min,PBST洗4次,5min/次;二抗为HRP标记的羊抗鼠IgG,室温孵育40min,PBST洗4次,5min/次;ECL显色后用Tanon5200全自动化学发光成像分析系统观察结果并扫描拍照。图4、图 5结果显示2F3、3D3单克隆抗体与EnGAM22重组蛋白发生特异性识别,条带大小均在29kDa左右。图6、图7结果显示2F3、3D3单克隆抗体与天然配子体蛋白发生特异性识别,条带大小均在35kDa左右。图8、图9结果显示2F3、3D3单克隆抗体不与柔嫩艾美耳球虫、堆型艾美耳球虫、巨型艾美耳球虫天然配子体蛋白发生特异性识别,结果表明2F3、3D3单抗特异性好。

[0057] 实施例10:Engam22基因表达产物在毒害艾美耳球虫配子体以及未孢子化卵囊上的免疫荧光定位

[0058] 将配子体、未孢子化卵囊PBS稀释涂于载玻上(显微镜下看到少量配子体即可);用提前预冷的甲醇作用10min,PBST洗涤3次,5min/次;0.1%Triton X室温作用10min,PBST洗涤3次,5min/次;10%山羊血清封闭,湿盒内37℃过夜封闭;一抗为杂交瘤细胞上清,湿盒内37℃孵育1h,PBST洗涤3次,5min/次;二抗为FITC标记的羊抗鼠IgG,用10%山羊血清1:100倍稀释,湿盒内 37℃孵育1h,PBST洗涤3次,5min/次;滴加抗荧光淬灭液封片,荧光显微镜观察结果。图10结果显示,未孢子化卵囊卵囊壁在荧光显微镜下自发蓝色荧光,配子体未出现自发蓝色荧光现象,2F3、3D3单克隆抗体可定位于毒害艾美耳球虫成壁体以及未孢子化卵囊卵囊壁,表明Engam22基因表达产物定位在成壁体以及未孢子化卵囊卵囊壁,随着配子体的生长发育,EnGAM22蛋白从成壁体转运到卵囊壁,参与卵囊壁的形成。

[0059] 上述实施方式为本发明专利的优选实施方式,对于本领域的技术人员在不脱离原理的情况下做出的非本质性的改进仍属于本发明专利要求保护的范畴。



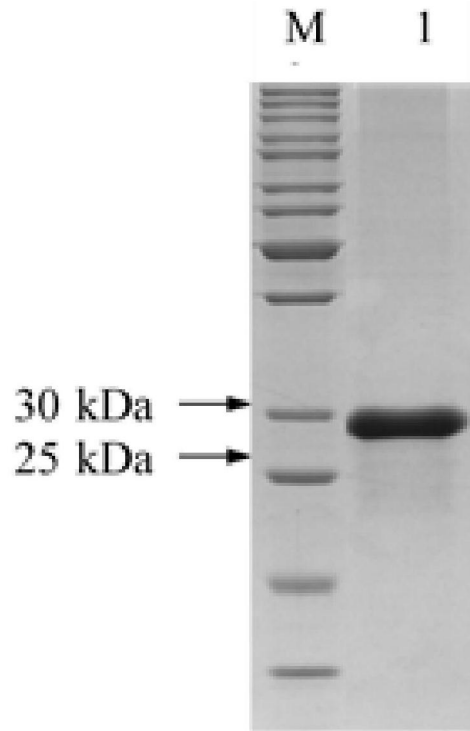


图1

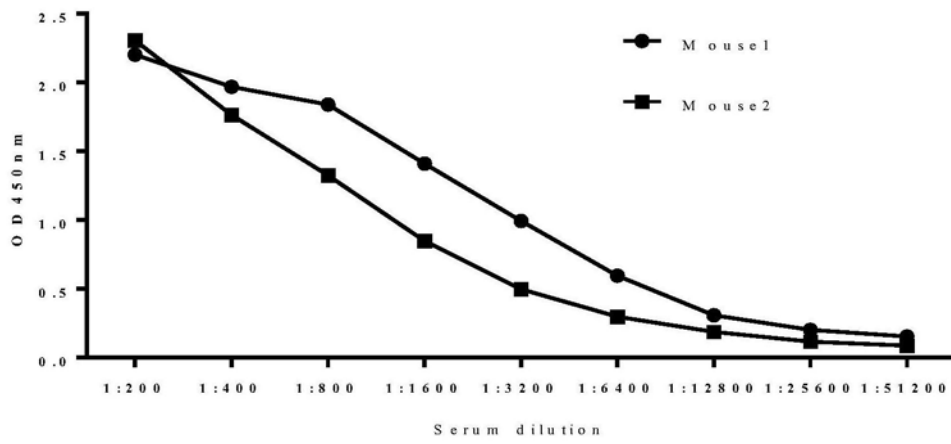


图2

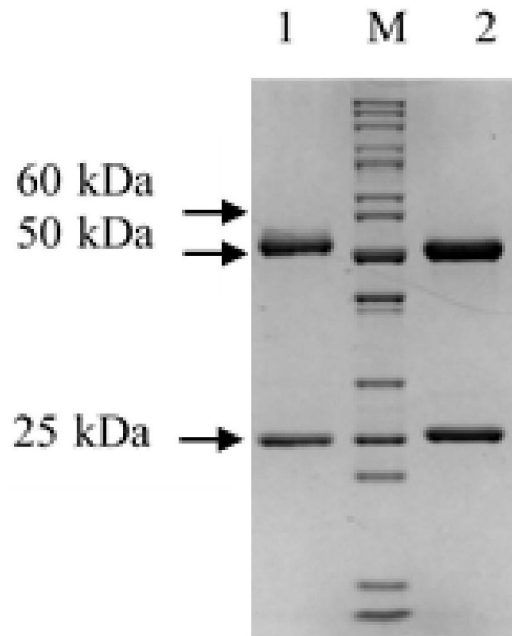


图3

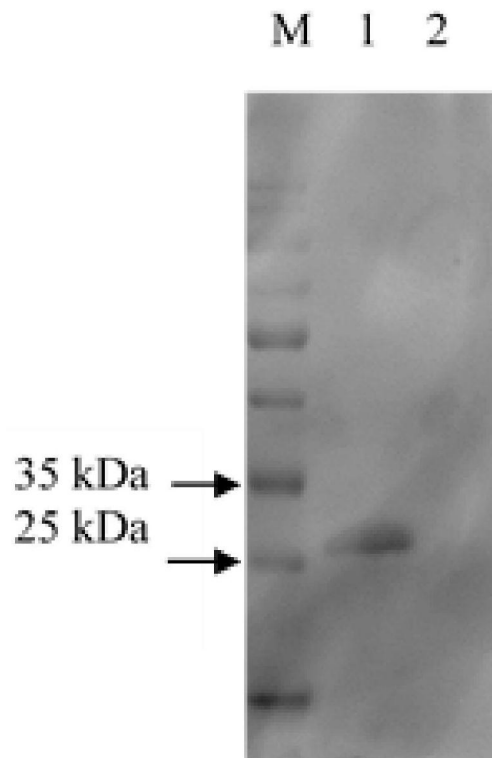


图4

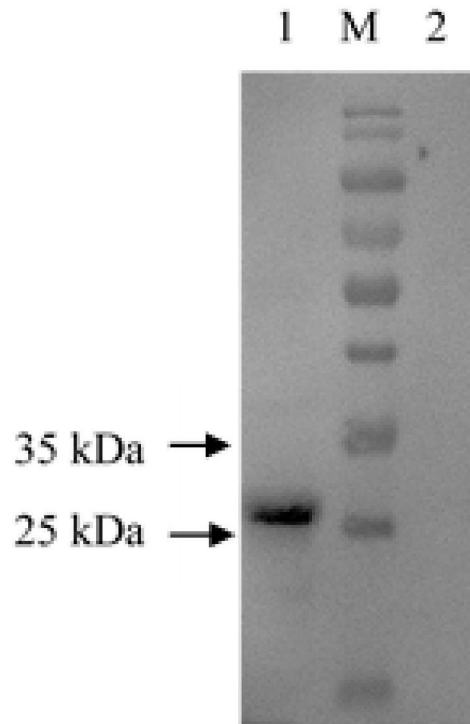


图5

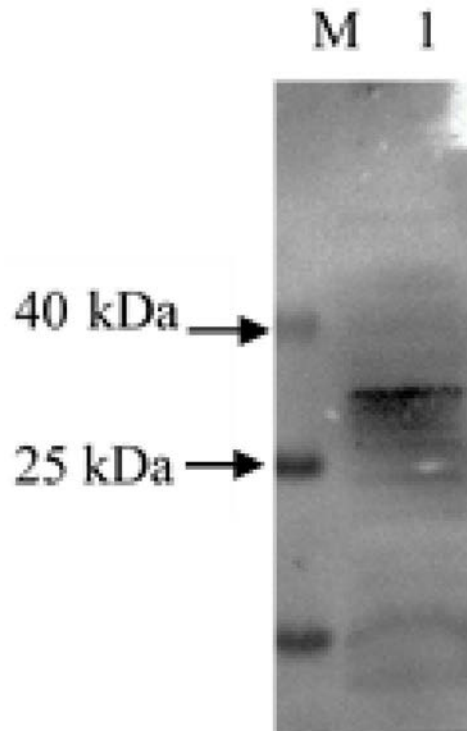


图6

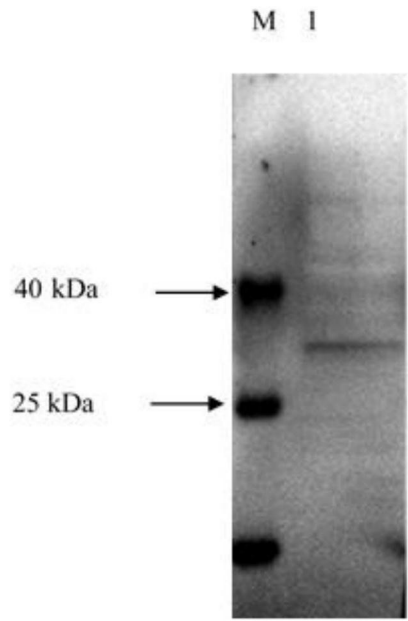


图7

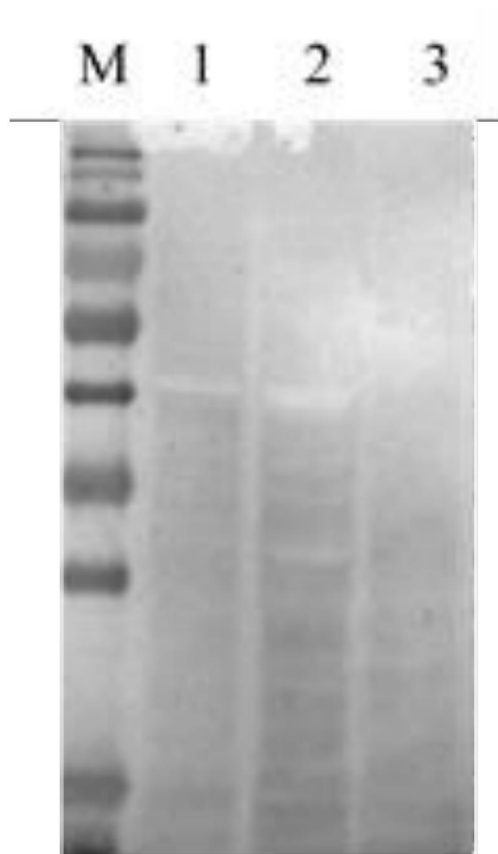


图8

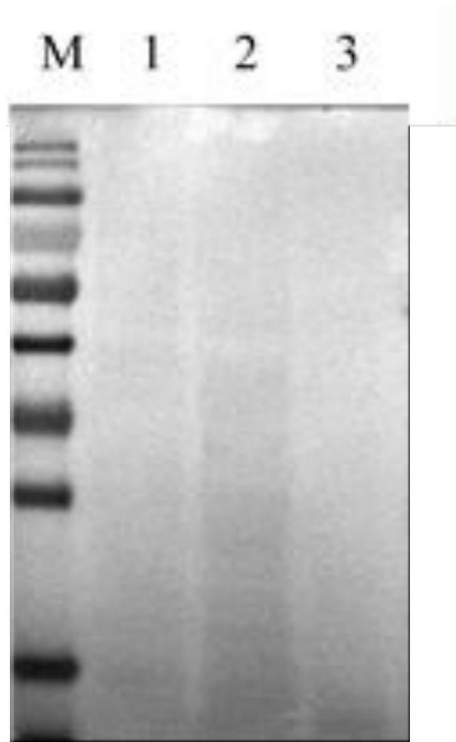


图9

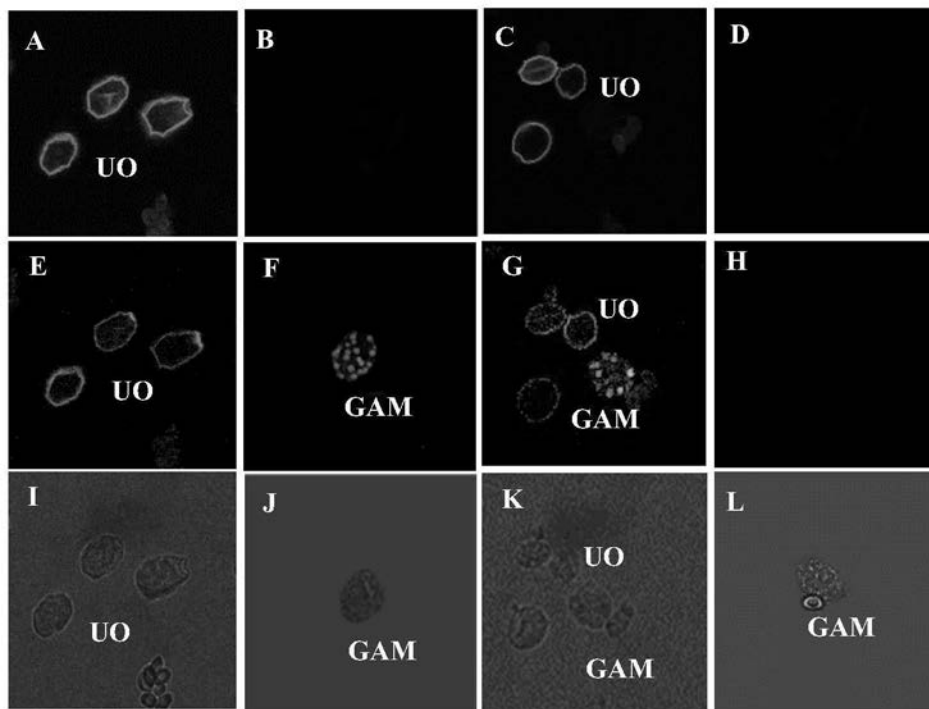


图10