



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107056931 B

(45)授权公告日 2020.07.03

(21)申请号 201710416141.5

(22)申请日 2017.06.05

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107056931 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(73)专利权人 江苏省家禽科学研究所  
地址 225000 江苏省扬州市邗江区仓颉路  
58号

(72)发明人 李慧芳 陶志云 宋卫涛 朱春红  
徐文娟 刘宏祥 章双杰 张小燕  
王晓峰 李新

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11371  
代理人 齐海迪

(51)Int.Cl.

C07K 14/705(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

(56)对比文件

WO 2004086039A2 ,2004.10.07,

NCBI.nucleotide-binding

oligomerization domain-containing protein  
1 isoform X1 [Zonotrichia albicollis].

《NCBI genbank database》.NCBI,2015,1.

陶志云.《鸡NOD1基因克隆、功能及信号通路  
的初步研究》.《CNKI》.2017,(第02期),第86页第  
2段.

审查员 周振威

权利要求书1页 说明书8页

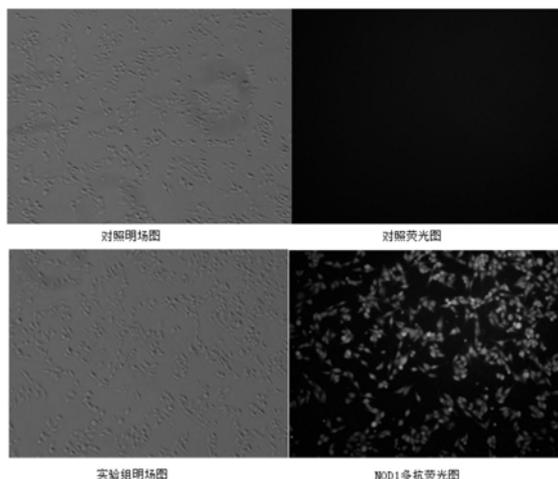
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种抗原肽和NOD1抗体及应用、制备方法和  
试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种抗原肽和NOD1抗体及应  
用、制备方法和试剂盒,涉及生物技术领域。本发  
明提供的抗原肽包括有SEQ ID NO:1所示的多肽  
片段,可用于免疫动物,制备可特异性识别结合  
NOD1蛋白的NOD1抗体;此外,本发明提供的NOD1  
抗体具有效价高、特异性好的特点,可有效地检  
测出组织和细胞中的NOD1蛋白尤其是鸭NOD1蛋  
白,具有很强的应用前景。



1. 一种抗原肽,其特征在于,所述抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID No.1或SEQ ID No.2所示。
2. 一种NOD1抗体的制备方法,其特征在于,其包括:用权利要求1所述的抗原肽免疫动物,所述方法不以疾病的诊断或治疗为目的;NOD1抗体为多克隆抗体。
3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,在免疫所述动物之前,所述方法还包括偶联步骤,所述偶联步骤包括:将所述抗原肽与载体蛋白接触。
4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述免疫的次数为两次或两次以上。
5. 一种NOD1抗体,其特征在于,其由权利要求2~4中任一项所述的NOD1抗体的制备方法所制得;NOD1抗体为多克隆抗体。
6. 权利要求5所述的NOD1抗体在制备检测NOD1蛋白的试剂盒中的应用。
7. 根据权利要求6所述的应用,所述检测包括western检测和免疫检测中的一种。
8. 一种用于检测NOD1蛋白的试剂盒,其特征在于,其包括权利要求5所述的NOD1抗体。

## 一种抗原肽和NOD1抗体及应用、制备方法和试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体而言,涉及一种抗原肽和NOD1抗体及应用、制备方法和试剂盒。

### 背景技术

[0002] NOD1 (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing proteins-1, 核苷酸寡聚化结构域1, 属NLR受体家族, NLRs) 是近年来发现的胞质型模式识别受体, 它通过识别病原相关分子模式 (PAMPs) 迅速启动先天性免疫, 并能通过信号传导启动适应性免疫, 在机体的免疫防御中发挥重要作用。

[0003] NLRs由NOD亚家族、NALP亚家族和其他3个成员组成。NOD1作为最具代表性的NOD亚家族成员, 在先天性免疫中参与炎症反应和细胞凋亡过程, 也与一些炎症性疾病的发生有关。目前, 哺乳动物NOD1基因的功能和作用机制的研究日益深入, 但禽类NOD1的研究起步较晚, 相关研究报道较少, 这与目前缺乏相应的特异性抗体, 使得在蛋白水平对禽类的NOD1进行功能和机制研究受到限制有关。

[0004] 鉴于此, 特提出本发明。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种抗原肽, 该抗原肽可用于免疫动物, 制备可特异性识别结合禽类NOD1蛋白的NOD1抗体。

[0006] 本发明的另一目的在于提供上述抗原肽在制备抗体中的应用。

[0007] 本发明的另一目的在于提供一种NOD1抗体的制备方法。通过该方法可制备出效价高、特异性好的可检测NOD1蛋白的NOD1抗体。

[0008] 本发明的另一目的在于提供一种NOD1抗体, 其由上述制备方法制备得到, 其具有特异性好、效价高的特点。

[0009] 本发明的另一目的在于提供上述NOD1抗体在检测NOD1蛋白中的应用。

[0010] 本发明的另一目的在于提供一种用于检测NOD1蛋白的试剂盒。

[0011] 本发明是这样实现的:

[0012] 一种抗原肽, 其包括SEQ ID NO:1所示的多肽片段。

[0013] 上述抗原肽在制备用于特异性结合NOD1蛋白的抗体中的应用。

[0014] 一种NOD1抗体的制备方法, 其包括: 用上述的抗原肽免疫动物。

[0015] 一种NOD1抗体, 其由上述的NOD1抗体的制备方法所制得。

[0016] 上述的NOD1抗体在检测NOD1蛋白中的应用。

[0017] 一种用于检测NOD1蛋白的试剂盒, 其包括上述的NOD1抗体。

[0018] 本发明的有益效果是:

[0019] 本发明提供的抗原肽包括有SEQ ID NO:1所示的多肽片段, 可用于免疫动物, 制备可特异性识别结合NOD1蛋白的NOD1抗体; 此外, 本发明提供的NOD1抗体具有效价高、特异性

好的特点,可有效地检测出组织和细胞中的NOD1蛋白尤其是鸭NOD1蛋白,具有很强的应用前景。

### 附图说明

[0020] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

[0021] 图1为本发明实施例4提供的采用实施例3的NOD1抗体通过western法检测组织和细胞中NOD1蛋白结果图;

[0022] 图2为本发明实施例5提供的采用实施例3的NOD1抗体通过免疫细胞化学方法检测鸭巨噬细胞中NOD1蛋白结果图;

[0023] 图3为本发明本实施例3提供的NOD1抗体的western blot检测结果图。

### 具体实施方式

[0024] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,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。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0025] 下面对本发明实施例的一种抗原肽和NOD1抗体及应用、制备方法和试剂盒进行具体说明。

[0026] 一方面,本发明提供了一种抗原肽,其包括SEQ ID NO:1所示的多肽片段。

[0027] 本发明的研究表明,SEQ ID NO:1所示的多肽片段与大分子载体蛋白偶联后,将该多肽片段免疫动物例如兔后得到抗体可以特异性识别结合鸭NOD1蛋白,能够检测出组织和细胞中的NOD1蛋白。

[0028] 将本发明提供的抗原肽免疫动物例如兔后可以得到特异性识别结合鸭NOD1蛋白的抗体,应用该抗体能够检测出组织和细胞中的NOD1蛋白例如鸭NOD1蛋白。因此,容易理解,含有或包括或具有SEQ ID NO:1所示的多肽片段的抗原肽也应当具有相同的或类似的免疫原性。

[0029] 进一步地,在本发明的一些实施方案中,上述抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。SEQ ID NO:2所示的抗原肽相对于SEQ ID NO:1所示的多肽片段在N端加C(半胱氨酸),以便于更好的与载体偶联。

[0030] 另一方面,本发明提供了上述抗原肽在制备用于特异性结合NOD1蛋白的抗体中的应用。

[0031] 例如,将上述抗原肽免疫动物制备出可以特异性结合NOD1蛋白的抗体。

[0032] 另一方面,本发明提供了一种NOD1抗体的制备方法,其包括以下步骤:

[0033] S1偶联:将上述的抗原肽与载体蛋白偶联。

[0034] 其中,载体蛋白可以是钥孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白、或卵清白蛋白。通过与载体蛋白的偶联,可以提高抗原肽的免疫原性。

- [0035] 优选地,在本发明的一些实施方案中,通过异型双功能连接剂(M-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, MBS)将抗原肽与KLH偶联。
- [0036] 可选地,在本发明的一些实施方案中,按如下方法进行偶联。
- [0037] A. 将适量的KLH放入浓度为10mg/mL的偶联缓冲液(硼酸盐缓冲液, pH8.5)中使之溶解。
- [0038] B. 转移完全溶解的KLH溶液到透析袋中,室温2小时或4℃透析过夜,去除多余的偶联缓冲液。
- [0039] C. 在一个干净的小瓶中用10mg/mL二甲基甲酰胺(DMF)溶解MBS。
- [0040] D. 将溶解的KLH溶液和MBS溶液以体积比为10:1的比例混合。
- [0041] E. 室温下,将KLH和MBS共同孵育30分钟以激活KLH。在孵育过程中应多次摇动瓶子。
- [0042] F. 将偶联缓冲液加到Sephadex G-25树脂柱中洗涤树脂,并用核酸蛋白检测器检测280nm的吸光度值,直到A280值稳定。
- [0043] G. 将配制好的活化的KLH的溶液上柱以去除多余的MBS和反应副产物。
- [0044] H. 收集流出的活化的KLH的液体到新的干净离心管中。
- [0045] I. 按1:1(w/w)的比例将活化的KLH添加到溶解的多肽瓶中。
- [0046] J. 将瓶置于室温下3小时以使多肽和KLH偶联。
- [0047] K. 将抗原肽-KLH偶联物溶液移到透析袋中4℃过夜透析以去除多余PBS缓冲液。
- [0048] L. 将抗原肽-KLH偶联物溶液小等分分装后储存在-20℃,备用。
- [0049] S2免疫:将得到的偶联物免疫动物。
- [0050] 其中,为了提高抗体的产量,免疫的次数为两次或两次以上。
- [0051] 可选地,在本方明的一些实施方案中,按如下方法进行免疫。
- [0052] A. 实验前采集动物血液,并制备免疫前血清。
- [0053] B. 初次免疫:每只兔子皮下多点注射乳化的1ml上述偶联物和弗氏完全佐剂的混合液(体积比1:1),多肽抗原含量为0.5mg;
- [0054] C. 第一次加强免疫:初次免疫后14天,每只兔子皮下多点注射乳化的1ml偶联物与弗氏不完全佐剂混合液,抗原肽含量为0.5mg;
- [0055] D. 一周后,采集血液制备血清,检测效价。第二次加强免疫,同第一次加强免疫。
- [0056] E. 一周后,采集血液制备血清,检测效价。第三次加强免疫,同第一次和第二次加强免疫。
- [0057] F. 一周后,采集血液制备血清,检测效价。
- [0058] S3纯化:亲和纯化免疫血清获取抗体
- [0059] 可选地,在本发明的一些实施方案中,按如下方法进行纯化。
- [0060] A. 将制备的免疫血清用PBS缓冲液调PH值为8.0。
- [0061] B. 将上述血清加入到ProteinA的亲和微珠上,比例为10:1,即10ml的免疫血清加入1ml微珠,室温孵育1h,轻轻摇动混匀。
- [0062] C. 将抗体包被的微珠转入合适的层析柱中,用PBS冲洗,收集流出的冲洗液直到A280吸光度稳定。
- [0063] D. 添加50mmol/L甘氨酸(PH3.0)洗脱结合到微球柱的抗体,收集洗脱液,立即添加

TRIS缓冲液到含有抗体的管中中和洗脱液至pH=7.0值。

[0064] E. 转移含抗体的洗脱液到透析袋,4℃过夜透析以去除PBS。

[0065] F. 用浓度为0.02%的叠氮化钠缓冲液加入抗体中,4℃储存。

[0066] 在本发明的一些实施方案中,按如下方法检测效价。

[0067] A. 用1%牛血清白蛋白(BSA)溶液稀释纯化的抗体或免疫后获得的免疫血清,每孔加入100μL抗原稀释液,浓度为4μg/ml。

[0068] B. 用粘合塑料覆盖膜盖板,置于37℃孵育2小时或在4℃过夜。

[0069] C. 用200μL的PBST(含0.1% tween20)的PBS洗板三次。

[0070] D. 每孔中添加200μL 5%BSA封闭液以阻断包被板的非特异性结合位点。

[0071] E. 用粘合塑料覆盖膜盖板,置于37℃孵育1小时或在℃过夜。

[0072] F. 用200μL的PBST洗板三次。

[0073] G. 用1%BSA按1:1000的比例稀释获得的免疫血清(或者是NOD1抗体作为一抗),然后再2倍梯度稀释,每板加入100μL稀释的抗血清。

[0074] H. 用粘合塑料板盖板,置于37℃孵育1小时或4℃过夜。

[0075] I. 用200μL的PBST洗板三次。

[0076] J. 用1%BSA按1:5000的比例稀释二抗(Anti-RABBIT IgG(H&L)(GOAT)Antibody Peroxidase Conjugated),每孔加入100μL。

[0077] K. 用粘合塑料板盖板,置于37℃孵育30分钟。

[0078] L. 用200μL的PBST洗板五次。

[0079] M. 每孔中加入100μL四甲基联苯胺(TMB)显色液。

[0080] N. 充分显色15-20分钟,每孔添加100μL的终止液。

[0081] O. 在450nm波长下读出每个孔的吸光度值。根据结果判断Elisa的效价。

[0082] 另一方面,本发明提供了一种NOD1抗体,其由上述的NOD1抗体的制备方法所制得。

[0083] 该NOD1抗体为多克隆抗体。

[0084] 另一方面,本发明提供了上述的NOD1抗体在检测NOD1蛋白中的应用。

[0085] 进一步地,在本发明的一些实施方案中,上述检测包括western检测和免疫检测中的一种。

[0086] 另一方面,本发明提供了一种用于检测NOD1蛋白的试剂盒,其包括权利上述的NOD1抗体。

[0087] 需要说明的是,本发明中的所指的动物可以是兔、鸡、牛、羊、小鼠以及马中的一种。

[0088] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0089] 实施例1

[0090] 本实施例提供了一种抗原肽,其氨基酸序列如EQ ID NO:1所示,为:NLISQEEAKAFENE。

[0091] 本实施例提供的抗原肽可用于免疫动物,能够制备出可特异性识别结合NOD1蛋白的NOD1抗体。

[0092] 实施例2

[0093] 本实施例提供了一种抗原肽,其氨基酸序列如EQ ID NO:2所示,为:

CNLSQEEAKAFENE。

[0094] 本实施例提供的抗原肽相对于实施例1提供的抗原肽在N端加C(半胱氨酸)以便于更好的与载体偶联。

[0095] 本实施例提供的抗原肽可通过人工合成(南京金斯瑞生物科技有限公司)的方式得到,合成的抗原肽进行MS鉴定,鉴定正确后进行纯化。采用HPLC法进行抗原肽的分离纯化并进行纯度鉴定,经检测抗原肽的纯度为95.9%。

[0096] 本实施例提供的抗原肽具有免疫原性,可用于免疫动物,能够制备出可特异性识别结合NOD1蛋白的NOD1抗体。

[0097] 实施例3

[0098] 本实施例提供了NOD1抗体的制备方法,其包括如下步骤:

[0099] 1用MBS将实施例2提供的抗原肽与KLH偶联,具体如下:

[0100] 1.1将适量的KLH放入浓度为10mg/mL的偶联缓冲液(硼酸盐缓冲液,pH8.5)中使之溶解。

[0101] 1.2转移完全溶解的KLH溶液到透析袋中,室温2小时或4℃透析过夜,去除多余的偶联缓冲液。

[0102] 1.3在一个干净的小瓶中用10mg/mL二甲基甲酰胺(DMF)溶解MBS。

[0103] 1.4将溶解的KLH溶液和MBS溶液以体积比为10:1的比例混合。

[0104] 1.5室温下,将KLH和MBS共同孵育30分钟以激活KLH。在孵育过程中应多次摇动瓶子。

[0105] 1.6将偶联缓冲液加到Sephadex G-25树脂柱中洗涤树脂,并用核酸蛋白检测器检测280nm的吸光度值,直到A280值稳定。

[0106] 1.7将配制好的活化的KLH的溶液上柱以去除多余的MBS和反应副产物。

[0107] 1.8收集流出的活化的KLH的液体到新的干净离心管中。

[0108] 1.9按1:1(w/w)的比例将活化的KLH添加到溶解的抗原肽瓶中。

[0109] 1.10将瓶置于室温下3小时以使抗原肽和KLH偶联。

[0110] 1.11将抗原肽-KLH偶联物溶液移到透析袋中4℃过夜透析以去除多余PBS缓冲液。

[0111] 1.12将抗原肽-KLH偶联物溶液小等分分装后储存在-20℃,备用,或直接用于后续步骤。

[0112] 2将上述获得的偶联物免疫新西兰兔

[0113] 2.1实验前采集动物血液,并制备免疫前血清。

[0114] 2.2初次免疫:每只兔子皮下多点注射乳化的1ml上述偶联物和弗氏完全佐剂的混合液(体积比1:1),其中,抗原肽含量为0.5mg。

[0115] 2.3第一次加强免疫:初次免疫后14天,每只兔子皮下多点注射乳化的1ml抗原肽-KLH偶联物溶液与弗氏不完全佐剂混合液,其中,抗原肽含量为0.5mg。

[0116] 2.4一周后,采集血液制备血清,检测效价。第二次加强免疫,同第一次加强免疫。

[0117] 2.5一周后,采集血液制备血清,检测效价。第三次加强免疫,同第一次和第二次加强免疫。

[0118] 2.6一周后,采集血液制备血清,检测效价。

[0119] 3.采用ELISA法检测抗原肽免疫新西兰兔后获得的免疫血清的效价,操作如下:

- [0120] 3.1用1%牛血清白蛋白(BSA)溶液稀释纯化的实施例2提供的抗原肽,每孔加入100 $\mu$ L抗原稀释液,浓度为4 $\mu$ g/ml。
- [0121] 3.2用粘合塑料覆盖膜盖板,置于37 $^{\circ}$ C孵育2小时或在4 $^{\circ}$ C过夜。
- [0122] 3.3用200 $\mu$ L的PBST(含0.1% tween20)的PBS洗板三次。
- [0123] 3.4每孔中添加200 $\mu$ L 5%BSA封闭液以阻断包被板的非特异性结合位点。
- [0124] 3.5用粘合塑料覆盖膜盖板,置于37 $^{\circ}$ C孵育1小时或在 $^{\circ}$ C过夜。
- [0125] 3.6用200 $\mu$ L的PBST洗板三次。
- [0126] 3.7用1%BSA按1:1000的比例稀释获得的抗血清,然后再2倍梯度稀释,每板加入100 $\mu$ L稀释的抗血清。
- [0127] 3.8用粘合塑料板盖板,置于37 $^{\circ}$ C孵育1小时或4 $^{\circ}$ C过夜。
- [0128] 3.9用200 $\mu$ L的PBST洗板三次。
- [0129] 3.10用1%BSA按1:5000的比例稀释二抗(Anti-RABBIT IgG(H&L)(GOAT)Antibody Peroxidase Conjugated),每孔加入100 $\mu$ L。
- [0130] 3.11用粘合塑料板盖板,置于37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。
- [0131] 3.12用200 $\mu$ L的PBST洗板五次。
- [0132] 3.13每孔中加入100 $\mu$ L四甲基联苯胺(TMB)显色液。
- [0133] 3.14充分显色15-20分钟,每孔添加100 $\mu$ L的终止液。
- [0134] 3.15在450nm波长下读出每个孔的吸光度值。根据结果判断Elisa的效价。结果见表1。

[0135] 表1

[0136]

	稀释倍数	OD值
NC	1:1000	0.087
1	1:1000	2.754
2	1:2000	2.682
3	1:4000	2.617
4	1:8000	2.392
5	1:16000	2.071
6	1:32000	1.785
7	1:64000	1.284
8	1:128000	0.827
9	1:256000	0.498
10	1:512000	0.306
11	空白	0.049
12	空白	0.049
	效价	1:512000

[0137] 注:其中NC为免疫前血清,作为阴性对照,开始稀释度为1:1000稀释,效价的判定以最高的稀释度的OD值/空白的OD值 $\geq 2$ 为标准。表中1-10代表步骤2.6得到的血清按不同比例稀释后的检测结果。

[0138] 从表1可看出,获得的免疫血清的效价达到1:512000,由此可见,本发明提供的

NOD1抗体的制备方法可制备出效价高的NOD1抗体。

[0139] 4免疫血清的亲纯化,按如下步骤进行:

[0140] 4.1将步骤2.6得到的免疫血清用PBS缓冲液调PH值为8.0。

[0141] 4.2将上述免疫血清加入到ProteinA的亲微珠上,比例为10:1,即10ml的免疫血清加入1ml微珠,室温孵育1h,轻轻摇动混匀。

[0142] 4.3将抗体包被的微珠转入合适的层析柱中,用PBS冲洗,收集流出的冲洗液直到A280吸光度稳定。

[0143] 4.4添加50mmol/L甘氨酸(PH3.0)洗脱结合到微球柱的NOD1抗体,收集洗脱液,立即添加TRIS缓冲液到含有抗体的管中中和洗脱液至pH=7.0值。

[0144] 4.5转移含NOD1抗体抗体的洗脱液到透析袋,4℃过夜透析以去除PBS。

[0145] 4.6用浓度为0.02%的叠氮化钠缓冲液加入NOD1抗体中,4℃储存。即得到纯化的NOD1抗体,经western blot检测,抗体纯度为92%(如图3所示,图中:M代表蛋白marker;1代表得到的NOD1抗体)。

[0146] 本实施例还提供了由上述方法制备得到的NOD1抗体。

[0147] 实施例4

[0148] 采用western法将实施例3提供的NOD1抗体用于检测组织和细胞中NOD1蛋白,具体操作如下:

[0149] ①配胶:分离胶为10%,上层胶为4%。

[0150] ②加样:将高邮鸭的脾脏、肝脏、小肠组织和细胞样品提取蛋白,加入蛋白上样缓冲液100℃变性处理后上样,上样量为10ul,100V恒压电泳2h。

[0151] ③转膜:湿转,100V,2h。

[0152] ④封闭:将膜取出后放入溶于TBST溶液的5%脱脂奶粉溶液中,室温放置1h。

[0153] ⑤加一抗:使用的一抗为实施3制备的NOD1抗体,稀释浓度为1:500,稀释液为5%脱脂奶粉,4℃孵育过夜。

[0154] ⑥洗膜:第二天取出,室温摇床放置30分钟平衡至室温后,TBST洗膜5次,每次5分钟。

[0155] ⑦加二抗:二抗为商品化的山羊抗兔抗体,稀释度为1:10000,稀释液为5%脱脂奶粉,室温孵育半小时。

[0156] ⑧洗膜TBST洗膜5次,每次5分钟。

[0157] ⑨显影:加显影底物ECL,X胶片曝光。

[0158] 结果如图1所示。通过western法可检测到高邮鸭肝脏、脾脏、小肠组织和鸭巨噬细胞中NOD1的表达,其条带在105kb左右,与目标条带相符。表明实施例3提供的NOD1抗体可以通过western法检测出组织和细胞中的NOD1蛋白。

[0159] 实施例5

[0160] 采用免疫细胞化学方法将实施例3提供的NOD1抗体用于检测鸭巨噬细胞中NOD1蛋白,具体方法如下:

[0161] ①分离培养鸭巨噬细胞于6孔细胞板中,密度为 $5 \times 10^5$ 个/ml。

[0162] ②24h后,移去培养液,用PBS洗3次,每次5min。

[0163] ③4%多聚甲醛固定15min,PBS洗3次,每次5min。

[0164] ④0.5% Triton X-100 孵育30min, PBS洗3次, 每次5min。

[0165] ⑤3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育15min, PBS洗3次, 每次5min。

[0166] ⑥按1:200的比例稀释一抗(实施例3提供的NOD1抗体), 加入200 $\mu$ l, 湿盒中4℃过夜。

[0167] ⑦第二天取出, 移除一抗, PBS洗3次, 每次5min。

[0168] ⑧按1:1000的比例加入二抗(羊抗兔IgG-FITC), 湿盒中孵育1h。

[0169] ⑨取出板后移除二抗, PBS洗3次, 每次5min。

[0170] ⑩树脂封片后, 荧光显微镜下观察荧光。

[0171] 结果如图2所示(图中:NOD1多抗即为NOD1抗体), 加入NOD1抗体的实验组可见明显的荧光, 未加入鸭NOD1多克隆抗体的对照组未见明显的荧光, 说明采用免疫细胞的方法以实施例3提供的NOD1抗体可作为一抗用于鸭巨噬细胞中NOD1蛋白的检测。

[0172] 综上, 本发明实施例提供的抗原肽包括有SEQ ID NO:1所示的多肽片段, 将其与载体蛋白偶联后, 可用于免疫动物, 制备可特异性识别结合NOD1蛋白的NOD1抗体; 此外, 本发明提供的NOD1抗体具有效价高、特异性好的特点, 可有效地检测出组织和细胞中的NOD1蛋白尤其是鸭NOD1蛋白, 具有很强的应用前景。

[0173] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已, 并不用于限制本发明, 对于本领域的技术人员来说, 本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内, 所作的任何修改、等同替换、改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。



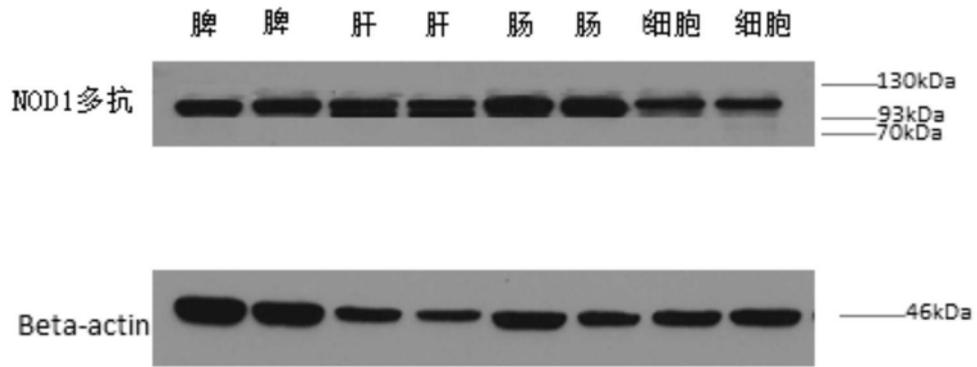


图1

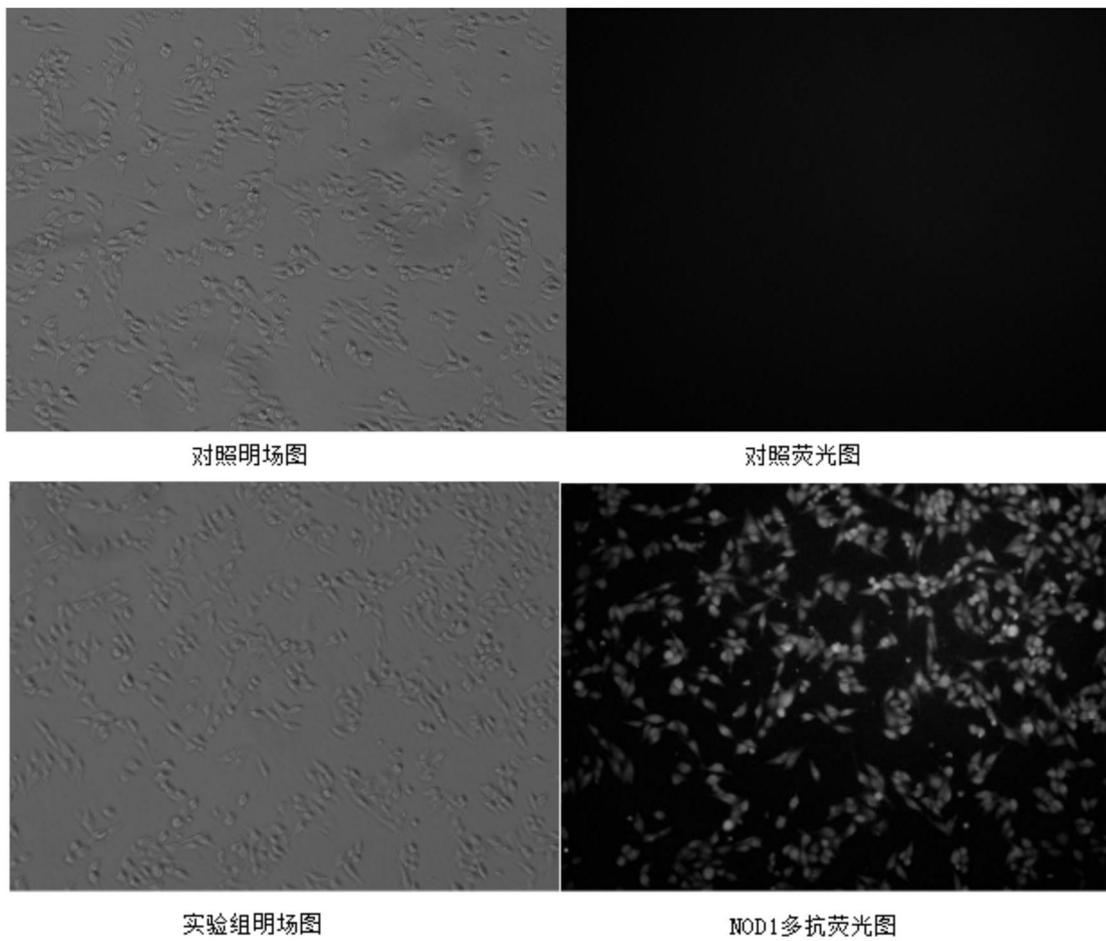


图2

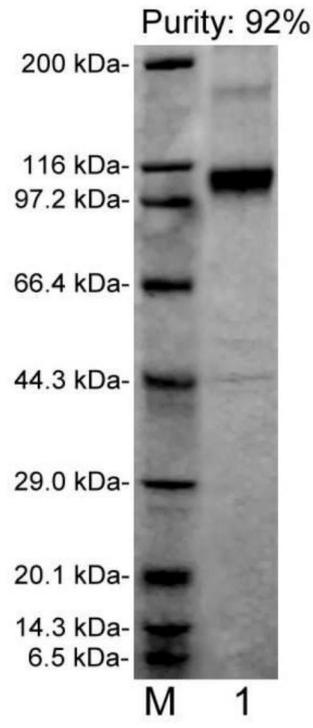


图3