



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102994445 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201210541987. 9

(22) 申请日 2012. 12. 14

(73) 专利权人 山东滨州沃华生物工程有限公司
地址 256603 山东省滨州市黄河六路 218 号
山东滨州沃华生物工程有限公司

(72) 发明人 陈申秒 董新荣 王常伟 徐海军
王楠

(74) 专利代理机构 济南舜源专利事务所有限公
司 37205

代理人 徐槐

(51) Int. Cl.

C12N 5/071(2010. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2010061000 A1, 2010. 06. 03,

CN 101879311 A, 2010. 11. 10,

CN 102127525 A, 2011. 07. 20,

仇华吉 等. 猪瘟兔化弱毒疫苗——半个世
纪的回顾. 《中国农业科学》. 2005, 第 38 卷 (第

8 期), 1675-1685.

李钟铎 等. 兔病毒性出血症病毒敏感细胞
的筛选. 《山东农业科学》. 1991, 14-16.

王镇 等. 猪瘟病毒弱毒株感染对体外培养
细胞增殖的促进作用. 《微生物学通报》. 2000, 第
27 卷 (第 2 期), 79-84.

王镇 等. 猪瘟病毒中国兔化弱毒疫苗株在
原代牛睾丸细胞中增殖特性的研究. 《中国病毒
学》. 2000, 第 15 卷 (第 2 期), 170-179.

审查员 梁婧文

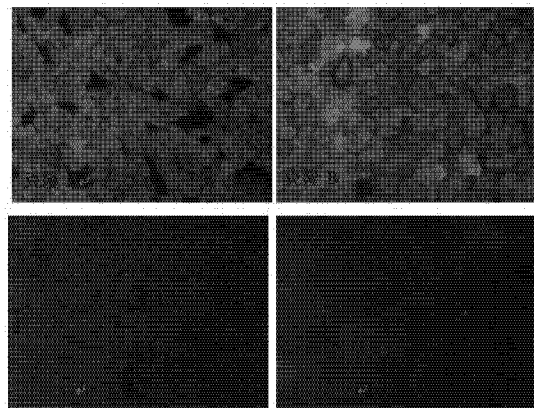
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种运用间接免疫荧光检测技术进行病毒敏
感细胞克隆中筛选的方法

(57) 摘要

发明涉及生物技术领域, 更具体的讲是一种
运用间接免疫荧光检测技术进行病毒敏感细胞
克隆株筛选的方法, 包括以下步骤: 细胞系纯净性
的鉴定; 细胞系中单克隆细胞株的获得; 单克隆
细胞株对病毒敏感性的鉴定, 本发明的有益效果
是: 本方法检测时间短, 只需 3 天即可对单细胞
克隆对病毒敏感性进行鉴定; 操作相对简单, 方法
易行, 可用于非致细胞病变型病毒敏感细胞株的
大量筛选; 结果稳定, 可重复性强, 与测定毒价方
法效果一致。



1. 一种运用间接免疫荧光检测技术进行病毒敏感细胞克隆株筛选的方法, 包括以下步骤:

(1) 细胞系纯净性的鉴定:

细胞的复苏培养: 用方瓶培养从液氮中复苏的细胞, 培养条件包括: pH7.0 ~ 7.3, 温度 36 ~ 37°C, 培养基为细胞培养液; 培养时间 48 ~ 96h, 细胞单层长至 90% ~ 100%, 细胞密度在 $3 \sim 6 \times 10^5$ cells/mL;

细胞传代培养: 将上述步骤中长满单层的细胞用 EDTA-胰酶消化分散, 获得细胞悬液, 按照 1:3 的比例分传至方瓶;

细胞接毒: 将 -80°C 保存的病毒抗原液 4 ~ 8°C 水中融化, 取适量病毒液加入上述传代细胞悬液中, 并保证病毒终浓度在 $100\text{TCID}_{50}/\text{mL} \sim 1000\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, 混匀, 置温箱培养 72 ~ 96h;

细胞带毒传代、铺 96 孔细胞板: 将长满单层的带毒细胞用 EDTA-胰酶消化分散, 获得细胞悬液, 并进行细胞计数, 取适量细胞悬液, 按照有限稀释法铺 96 孔板, 以获得单克隆细胞, 温箱培养, 直至单克隆细胞形成细胞岛;

细胞系纯净性的判定: 按照间接免疫荧光法, 对上述孔板进行 IFA 染色, 荧光显微镜下观察结果, 通过 IFA 荧光和单克隆细胞岛细胞形态观察, 判断细胞系纯净性;

(2) 细胞系中单克隆细胞株的获得

复苏细胞: 复苏代次靠前的细胞, 在 3 代内调整细胞至状态最佳;

分散细胞: 待细胞长至 90% 时, 用 EDTA-胰酶消化分散, 镜下观察细胞多数呈单个分散状态;

终点稀释细胞: 取 10uL 消化好的细胞入含 1mL 10% 血清的培养基的指形管内, 分散均匀后, 依次 10 倍倍比稀释, 吸取 10^{-4} 至 10^{-5} 稀释度的细胞悬液 150uL 入 96 孔板, 观察各梯度内的细胞个数, 并以一个细胞的稀释度为基准稀释细胞, 铺入 96 孔板中, 150uL/孔;

观察记录: 3 天后, 观察板内单个细胞岛的克隆, 作好标记;

维持细胞生长: 及时更换细胞培养液, 维持细胞生长, 必要时将细胞克隆消化分散, 重新在原孔贴附生长;

扩大培养细胞: 待上述 96 孔板内标记的细胞孔长满后, 扩大培养, 冻存保种;

(3) 单克隆细胞株对病毒敏感性的鉴定

单克隆细胞株的接毒: 待细胞长至单层, 将不同的单克隆细胞株用 EDTA-胰酶消化分散, 获得细胞悬液, 按 1:2 比例分传, 铺 96 孔板, 每个细胞株铺 3 ~ 6 个孔, 100uL/孔, 将预冷、无血清细胞培养液稀释好的病毒同步接上述 96 孔板细胞悬液中, 100uL/孔, 病毒接种剂量为 $10 \sim 100\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, 同时设阴性对照和阳性对照, 将细胞板置温箱培养 36 ~ 60h;

单克隆细胞株的敏感性鉴定: 将上述单克隆细胞株的接毒步骤中的 96 孔板取出, 按照间接免疫荧光法进行 IFA 染色, 荧光显微镜下计数荧光斑数目, 并利用 SPSS 软件对不同克隆细胞株及正常细胞系荧光斑数目进行统计学分析, 判断细胞敏感性差异;

上述间接免疫荧光法的具体步骤为:

a、将细胞培养板从培养箱中取出, 弃去培养板孔内液体, 用 0.1mol/L、pH7.2 的 PBS 洗涤 3 次, 每次 2 ~ 3min, 并甩干;

b、加入 -20°C 预冷的甲醇 100 uL, 4°C 固定 20 ~ 30min;

- c、弃去甲醇,室温自然挥干 5min, PBS 洗涤 3 次,每次 2 ~ 3min,并甩干;
- d、加入第一抗体,37℃吸附 50min;
- e、弃去第一抗体,用 PBS 洗涤 3 次,每次 2 ~ 3min,并甩干;
- f、加入第二抗体,37℃吸附 40min;
- g、弃去第二抗体, PBS 洗涤 3 次,每次 2 ~ 3min;
- h、置于荧光显微镜下观察荧光情况,观察荧光染色情况;

上述第一抗体为 PBS 稀释的猪瘟阳性血清。

2. 根据权利要求 1 所述的一种运用间接免疫荧光检测技术进行病毒敏感细胞克隆株筛选的方法,其特征在于:所述步骤 a、c、e、g 中 PBS 的浓度为 0.1mol/L、PH 为 7.2。

3. 根据权利要求 1 所述的一种运用间接免疫荧光检测技术进行病毒敏感细胞克隆株筛选的方法,其特征在于:所述步骤(3)中阴性对照为不接毒正常未纯化的细胞系。

4. 根据权利要求 1 所述的一种运用间接免疫荧光检测技术进行病毒敏感细胞克隆株筛选的方法,其特征在于:所述步骤(3)中阳性对照为接毒正常未纯化的细胞系。

5. 根据权利要求 1 所述的一种运用间接免疫荧光检测技术进行病毒敏感细胞克隆株筛选的方法,其特征在于:所述步骤(3)中将细胞板置温箱培养 45h。

6. 根据权利要求 1 所述的一种运用间接免疫荧光检测技术进行病毒敏感细胞克隆株筛选的方法,其特征在于:所述第二抗体为 PBS 稀释的 FITC 标记兔抗猪 IgG。

一种运用间接免疫荧光检测技术进行病毒敏感细胞克隆中筛选的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体的讲是一种运用间接免疫荧光检测技术进行病毒敏感细胞克隆株筛选的方法。

背景技术

[0002] 传统上,对于敏感细胞株的筛选是通过测定病毒毒价的方式实现的。然而,对于非致病变性的病毒,毒价的测定只能利用动物或其他方法进行,例如猪瘟兔化弱毒效价的测定。此种方法,费时费力,操作复杂,周期长,成本高,筛选效率低下。

发明内容

[0003] 针对以上不足,本发明提供了一种简便、快捷的敏感细胞株的筛选方法,具体的说,通过间接免疫荧光(IFA)方法进行细胞系纯净性的鉴定和不同单克隆细胞株敏感性鉴定,代替传统的病毒毒价的测定方法,以达到快速、简便、有效筛选单克隆细胞株的目的。

[0004] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0005] 一种运用间接免疫荧光检测技术进行病毒敏感细胞克隆株筛选的方法,包括以下步骤:

[0006] (1) 细胞系纯净性的鉴定:

[0007] 细胞的复苏培养:用方瓶培养从液氮中复苏的细胞,培养条件包括:pH7.0~7.3,温度36~37°C,培养基为细胞培养液;培养时间48~96h,细胞单层长至90%~100%,细胞密度在 $3\sim 6\times 10^5$ cells/mL;

[0008] 细胞传代培养:将上述步骤中长满单层的细胞用EDTA-胰酶消化分散,获得细胞悬液,按照1:3的比例分传至方瓶;

[0009] 细胞接毒:将-80°C保存的病毒抗原液4~8°C水中融化,取适量病毒液加入上述传代细胞悬液中,并保证病毒终浓度在 $100\text{TCID}_{50}/\text{mL}\sim 1000\text{TCID}_{50}/\text{mL}$,混匀,置温箱培养72~96h;

[0010] 细胞带毒传代、铺96孔细胞板:将长满单层的带毒细胞用EDTA-胰酶消化分散,获得细胞悬液,并进行细胞计数,取适量细胞悬液,按照有限稀释法铺96孔板,以获得单克隆细胞,温箱培养,直至单克隆细胞形成细胞岛;

[0011] 细胞系纯净性的判定:按照间接免疫荧光法,对上述孔板进行IFA染色,荧光显微镜下观察结果,通过IFA荧光和单克隆细胞岛细胞形态观察,判断细胞系纯净性;细胞形态不同,单克隆株细胞感染荧光不同即具有不同的单克隆株,表明细胞系不纯净;

[0012] (2) 细胞系中单克隆细胞株的获得

[0013] 复苏细胞:复苏代次靠前的细胞,在3代内调整细胞至状态最佳;

[0014] 分散细胞:待细胞长至90%时,用EDTA-胰酶消化分散,镜下观察细胞多数呈单个分散状态;

[0015] 终点稀释细胞 :取 10uL 消化好的细胞入含 1mL 10% 血清的培养基的指形管内,分散均匀后,依次 10 倍倍比稀释,吸取 10^{-4} 至 10^{-5} 稀释度的细胞悬液 150uL 入 96 孔板,观察各梯度内的细胞个数,并以一个细胞的稀释度为基准稀释细胞,铺入 96 孔板中, 150uL/ 孔 ;

[0016] 观察记录 :3 天后,观察板内单个克隆的细胞岛,作好标记 ;

[0017] 维持细胞生长 :及时更换细胞培养液,维持细胞生长,必要时将细胞克隆消化分散,重新在原孔贴附生长 ;

[0018] 扩大培养细胞 :待上述 96 孔板内标记的细胞孔长满后,扩大培养,冻存保种 ;

[0019] (3) 单克隆细胞株对病毒敏感性的鉴定

[0020] 单克隆细胞株的接毒 :待细胞长至单层,将不同的单克隆细胞株用 EDTA- 胰酶消化分散,获得细胞悬液,按 1:2 比例分传,铺 96 孔板,每个细胞株铺 3 ~ 6 个孔,100uL/ 孔,将预冷、无血清细胞培养液稀释好的病毒同步接上述 96 孔板细胞悬液中,100uL/ 孔,病毒接种剂量为 $10 \sim 100\text{TCID}_{50}/\text{mL}$,同时设阴性对照和阳性对照,将细胞板置温箱培养 36 ~ 60h ;

[0021] 单克隆细胞株的敏感性鉴定 :将上述单克隆细胞株的接毒步骤中的 96 孔板取出,按照间接免疫荧光法进行 IFA 染色,荧光显微镜下计数荧光斑数目,并利用 SPSS 软件对不同克隆细胞株及正常细胞系荧光斑数目进行统计学分析,判断细胞敏感性差异。

[0022] 上述间接免疫荧光法的具体步骤为 :

[0023] a、将细胞培养板从培养箱中取出,弃去培养板孔内液体,用 0. 1mol/L、PH7. 2 的 PBS 洗涤 3 次,每次 2 ~ 3min,并甩干 ;

[0024] b、加入 -20°C 预冷的甲醇 100 uL, 4°C 固定 20 ~ 30min ;

[0025] c、弃去甲醇,室温自然挥干 5min, PBS 洗涤 3 次,每次 2 ~ 3min,并甩干 ;

[0026] d、加入第一抗体, 37°C 吸附 50min ;

[0027] e、弃去第一抗体,用 PBS 涤 3 次,每次 2 ~ 3min,并甩干 ;

[0028] f、加入第二抗体, 37°C 吸附 40min ;

[0029] g、弃去第二抗体, PBS 涤 3 次,每次 2 ~ 3min ;

[0030] h、置于荧光显微镜下观察荧光情况,观察荧光染色情况。

[0031] 上述 PBS 的浓度为 0. 1mol/L、PH 为 7. 2。

[0032] 上述步骤(3) 中阴性对照为不接毒正常未纯化的细胞系。

[0033] 上述步骤(3) 中阳性对照为接毒正常未纯化的细胞系。

[0034] 上述步骤(3) 中将细胞板置温箱培养 45h。

[0035] 上述第一抗体为 PBS 稀释的猪瘟阳性血清。

[0036] 上述第二抗体为 PBS 稀释的 FITC 标记兔抗猪 IgG。

[0037] 本发明的有益效果是 :

[0038] 1. 本方法检测时间短,只需 3 天即可对单细胞克隆对病毒敏感性进行鉴定。

[0039] 2. 操作相对简单,方法易行,可用于非致病型病毒敏感细胞株的大量筛选。

[0040] 3. 结果稳定,可重复性强,与测定毒价方法效果一致。

附图说明

[0041] 图 1 为对克隆 A、B、C 检测结果以及对照试验 ;

[0042] 图 2 为对克隆 D、E、F、G 检测结果。

具体实施方式

[0043] 下面结合附图和具体实施例对本发明做进一步说明,以便本领域技术人员可以更好的了解本发明,但并不因此限制本发明。

[0044] (1) 细胞系纯净性的鉴定:

[0045] ST 细胞的复苏培养:用方瓶培养从液氮中复苏的 ST 细胞,培养条件包括:pH7.2, 温度 37℃,培养基为含有 8% 猪瘟专用血清的 MEM;培养时间 72h,细胞单层长至 100%;

[0046] ST 细胞传代培养:将长满单层的 ST 细胞用 EDTA-胰酶消化分散,获得细胞悬液,按照 1:3 的培养面积比例分传至方瓶;

[0047] 细胞接毒:将 -80℃ 保存的猪瘟兔化弱毒(中国兽医药品监察所保藏,保藏号 AV1412)细胞毒(毒价为 $10^{3.0}$ TCID₅₀/0.1mL)4 ~ 8℃ 水中融,取 500uL 病毒液,加入到上述方瓶传代细胞悬液(10mL)中,病毒终浓度为 500TCID₅₀/mL,混匀,置温箱培养 72h。

[0048] ST 细胞带毒传代、铺 96 孔细胞板:将长满单层的带毒 ST 细胞用 EDTA-胰酶消化分散,获得细胞悬液,并进行细胞计数,取适量细胞悬液,按照有限稀释法铺 96 孔板,以获得单克隆细胞,温箱培养,直至单克隆细胞形成细胞岛。

[0049] 细胞系纯净性的判定:按照间接免疫荧光法,对上述孔板进行 IFA 染色,分别在荧光显微镜和普通显微镜下观察结果,通过 IFA 荧光和单克隆细胞岛细胞形态观察,判断细胞系纯净

[0050] 性。细胞形态不同,单克隆株细胞感染荧光不同即表明细胞系不纯净。

[0051] ST 细胞系纯净性鉴定结果

[0052] 将 ST 细胞接猪瘟兔化弱毒,并带毒传至 96 孔板,培养 72h,进行 IFA 染色,结果发现,ST 细胞不同单克隆细胞形成的单克隆岛荧光染色效果不同,呈现不同的荧光亮度,表明该 ST 细胞系种存在对猪瘟病毒敏感性不同的克隆株。结果如图 1 所示,克隆 A、B 为猪瘟敏感型细胞株,而克隆 C 则不敏感。

[0053]

表 1 ST 单克隆细胞 IFA 染色荧光斑数目结果及比较

实验顺序	细胞株名称	荧光斑数目	荧光斑平均数	统计学比较 (P)
实验一	正常 ST (阳性)	30.0	28.7	-
		25.0		
		31.0		
	1	8.0	6.0	P < 0.01
		3.0		
		7.0		
	2	9.0	10.7	P < 0.01
		13.0		
		10.0		
	3	25.0	17.3	P < 0.01
		12.0		
		15.0		
	4	8.0	11.3	P < 0.01
		14.0		
		12.0		
	5	1.0	1.7	P < 0.01
		3.0		
		1.0		
	6	15.0	18.3	P=0.03 < 0.05
		21.0		
		19.0		
	7	10.0	13.3	P < 0.01
		18.0		
		12.0		
正常 ST (阴性)	0.0	0.0	-	
	0.0			
	0.0			

[0054]

实验二	正常 ST (阳性)	21.0	24.0	-
		22.0		
		29.0		
	8	14.0	12.7	P=0.001 < 0.01
		10.0		
		14.0		
	9	18.0	19.3	P=0.083 > 0.05
		19.0		
		21.0		
	10	14.0	13.0	P=0.001 < 0.01
		12.0		
		13.0		
11	14.0	14.7	P=0.001 < 0.03	
	19.0			
	11.0			
正常 ST (阴性)	0.0	0.0	-	
	0.0			
	0.0			
实验三	正常 ST (阳性)	21.0	23.3	-
		25.0		
		24.0		
	12	10.0	12.3	P=0.001 < 0.01
		13.0		
		14.0		
	13	5.0	5.0	P < 0.01
		6.0		
		4.0		
	14	5.0	7.7	P < 0.01
		6.0		
		12.0		
正常 ST (阴性)	0.0	0.0	-	
	0.0			
	0.0			

实验四	正常 ST (阳性)	14.0	10.0	-
		9.0		
		7.0		
	15	10.0	14	P=0.28 > 0.05
		17.0		
		16.0		
	16	20.0	20.3	P=0.025 < 0.05
		14.0		
		27.0		
	17	12.0	9.3	P=0.863 > 0.05
		5.0		
		11.0		
	正常 ST (阴性)	0.0	0.0	-
		0.0		
		0.0		

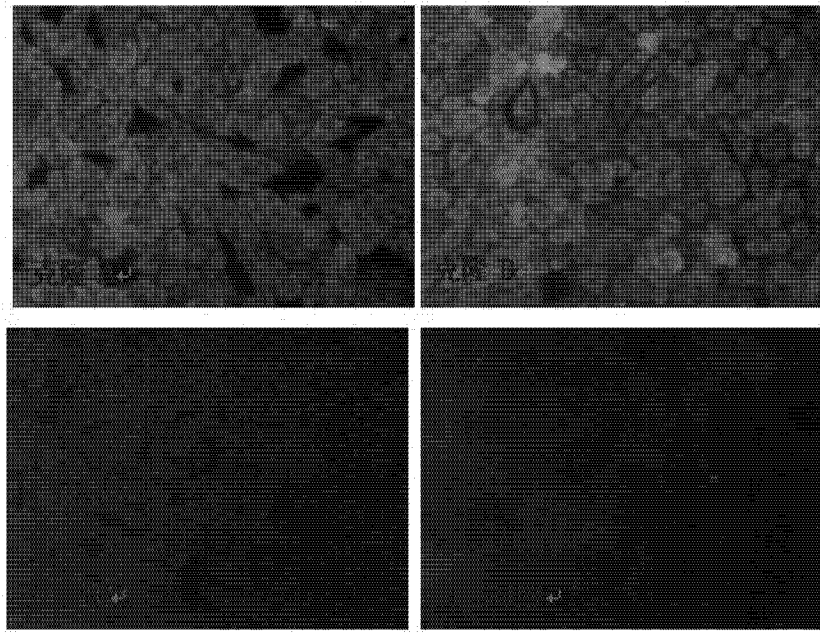


图 1

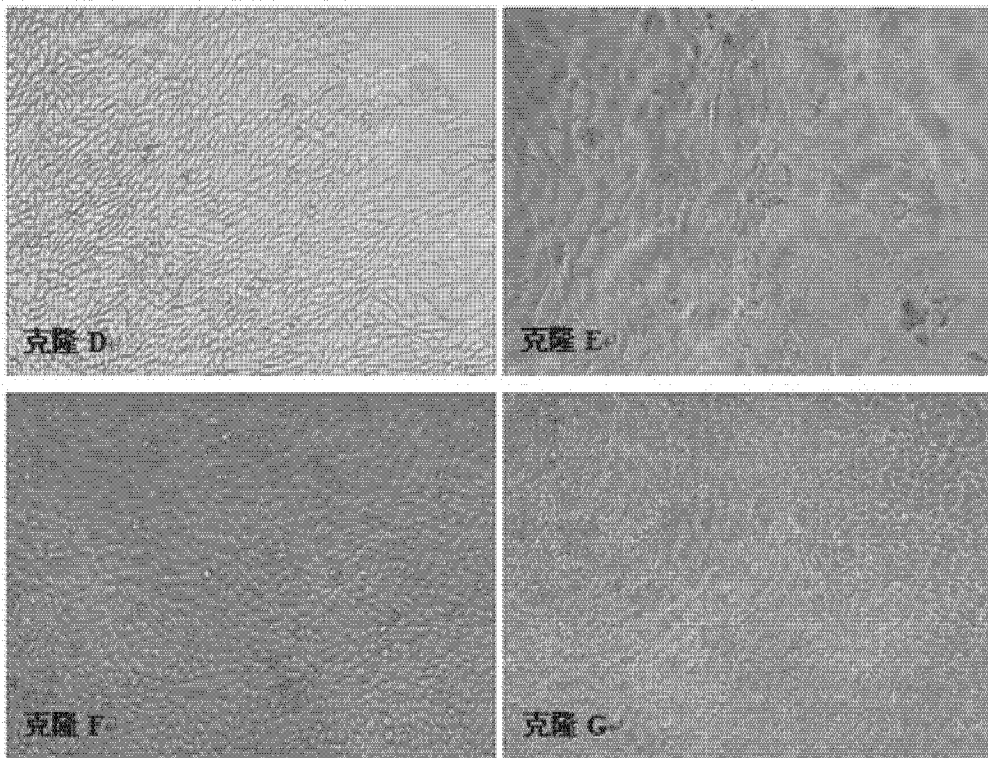


图 2

专利名称(译)	一种运用间接免疫荧光检测技术进行病毒敏感细胞克隆中筛选的方法		
公开(公告)号	CN102994445B	公开(公告)日	2015-10-07
申请号	CN201210541987.9	申请日	2012-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	山东滨州沃华生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	山东滨州沃华生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	山东滨州沃华生物工程有限公司		
[标]发明人	陈申秒 董新荣 王常伟 徐海军 王楠		
发明人	陈申秒 董新荣 王常伟 徐海军 王楠		
IPC分类号	C12N5/071 G01N33/53		
其他公开文献	CN102994445A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

发明涉及生物技术领域，更具体的讲是一种运用间接免疫荧光检测技术进行病毒敏感细胞克隆株筛选的方法，包括以下步骤：细胞系纯净性的鉴定；细胞系中单克隆细胞株的获得；单克隆细胞株对病毒敏感性的鉴定，本发明的有益效果是：本方法检测时间短，只需3天即可对单细胞克隆对病毒敏感性进行鉴定；操作相对简单，方法易行，可用于非致细胞病变型病毒敏感细胞株的大量筛选；结果稳定，可重复性强，与测定毒价方法效果一致。

