



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110018304 A

(43)申请公布日 2019.07.16

(21)申请号 201910403535.6

(22)申请日 2019.05.15

(71)申请人 河南省农业科学院

地址 450000 河南省郑州市金水区花园路
116号

(72)发明人 张改平 李青梅 郭军庆 王丽
孙亚宁 刘金玲 马凡舒 杨继飞
柴书军 邢广旭 张二芹 罗俊

(74)专利代理机构 郑州市华翔专利代理事务所
(普通合伙) 41122

代理人 张爱军

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书3页 说明书16页 附图5页

(54)发明名称

一种新城疫抗体阻断检测试纸

(57)摘要

本发明公开了一种新城疫抗体阻断检测试纸,由支撑板、抗原垫、金标垫、检测膜和吸水垫构成,抗原垫吸附新城疫病毒检测抗原,金标垫吸附胶体金标记的抗新城疫病毒单克隆抗体mAb1,检测膜上含有检测线T“|”和质控线C“|”印迹,检测线T为抗新城疫病毒单克隆抗体mAb2或抗新城疫病毒多克隆抗体pAb1印迹“|”,质控线C为兔抗小鼠IgG抗体pAb2或金黄色葡萄球菌SPA印迹“|”。本发明试纸实现了新城疫病毒中和抗体的快速检测,可实现对新城疫母源抗体和免疫抗体水平的实时监测,以及疫苗免疫效果的免疫评价,并且操作简单,人人都可操作,能较好满足不同层次人员的需要,易于大范围推广应用,具有广阔的市场前景和较大的经济、社会效益。

1. 一种新城疫抗体阻断检测试纸,由支撑板、抗原垫、金标垫、检测膜和吸水垫构成,其特征在于,抗原垫吸附新城疫病毒检测抗原,金标垫吸附胶体金标记的抗新城疫病毒单克隆抗体mAb1,检测膜上含有检测线T“|”和质控线C“|”印迹,检测线T为抗新城疫病毒单克隆抗体mAb2或抗新城疫病毒多克隆抗体pAb1印迹“|”,质控线C为兔抗小鼠IgG抗体pAb2或金黄色葡萄球菌SPA印迹“|”。

2. 根据权利要求1所述的新城疫抗体阻断检测试纸,其特征在于,抗新城疫病毒单克隆抗体mAb1具有血凝抑制HI和病毒中和VN活性,特异识别HN蛋白中和抗原表位;单克隆抗体mAb2具有血凝抑制HI活性,特异识别HN蛋白非中和抗原表位;新城疫病毒检测抗原为病毒抗原,HN蛋白重组抗原或多肽抗原。

3. 根据权利要求1所述的新城疫抗体阻断检测试纸,其特征在于,所述试纸是以单克隆抗体阻断模式检测新城疫病毒中和抗体,当检测膜显现两条红色条带“||”,且检测线T显色强度与空白对照相当,为新城疫病毒抗体阴性;显现两条红色条带“||”,但检测线T明显弱于空白对照,为新城疫病毒抗体弱阳性;只显现一条红色条带“|”,为新城疫病毒抗体强阳性。

4. 根据权利要求1所述的新城疫抗体阻断检测试纸,其特征在于,所述抗新城疫病毒单克隆抗体mAb1和mAb2的制备方法为:

(1) 新城疫病毒免疫抗原的制备

以新城疫病毒标准强毒株F48E8经尿囊腔接种9~11日龄SPF鸡胚,36~48h收取尿囊液,差速离心纯化病毒抗原,4℃3000r/min低速离心30min去除杂质,4℃60000r/min超速离心1h,用7mL 0.01mol/L PBS (pH值7.2) 重悬沉淀,以血凝试验测定新城疫病毒的HA效价达 2^{12} 以上;

(2) 抗新城疫病毒单克隆抗体的制备

(2.1) 杂交瘤细胞株的建立

将新城疫病毒免疫抗原免疫小鼠,建立抗新城疫病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株;

(2.2) 单克隆抗体的制备

(2.3) 单克隆抗体的鉴定

(2.3.1) 病毒反应谱

用NDV标准毒株、流行毒株和弱毒疫苗株I系、IV系感染鸡胚成纤维细胞或仓鼠肾细胞,以免疫过氧化物酶单层细胞试验测定单克隆抗体阳性克隆与NDV流行毒株的反应性,筛选获得识别NDV标准毒株、流行毒株和弱毒疫苗株的广谱单克隆抗体;

(2.3.2) 识别病毒蛋白

以鸡抗NDV多克隆抗体IgG包被96孔酶标板,转基因水稻表达NDV HN蛋白和F蛋白为检测抗原,以夹心ELISA检测不同株单克隆抗体阳性克隆识别的病毒蛋白,筛选获得特异识别HN蛋白单克隆抗体和特异识别F蛋白的单克隆抗体;

(2.3.3) 血凝抑制(HI)活性

以免疫过氧化物酶单层细胞试验测定单克隆抗体腹水的单抗效价,以血凝抑制试验测定单克隆抗体腹水的HI活性,筛选获得具有血凝抑制活性的单克隆抗体,作为单克隆抗体mAb2,用于检测线T印迹;

(2.3.4) 病毒中和(VN)活性

以病毒中和试验测定单克隆抗体腹水对不同NDV毒株的中和活性,筛选获得具有病毒中和活性单克隆抗体,作为单克隆抗体mAb1,用于胶体金标记;

(2.3.5) 单克隆抗体亚型鉴定

利用单克隆抗体亚型鉴定试剂盒测定抗NDV单克隆抗体的免疫球蛋白亚型;

(2.3.6) 抗原表位分析

利用重叠合成多肽对抗NDV单克隆抗体识别的抗原表位进行分析;

(2.4) 单克隆抗体的纯化

以辛酸-硫酸铵法从小鼠腹水中纯化单抗IgG。

5. 根据权利要求2所述的新城疫抗体阻断检测试纸,其特征在于,病毒抗原为经甲醛或 β -丙内酯BPL灭活的新城疫病毒尿囊液。

6. 根据权利要求5所述的新城疫抗体阻断检测试纸,其特征在于,病毒抗原的具体制备方法为:以新城疫病毒疫苗株LaSota经尿囊腔接种9~11日龄SPF鸡胚,36~120h收取鸡胚尿囊液,4℃3000r/min低速离心30min,取上清,以血凝试验测定新城疫病毒的HA效价达 2^{-12} 以上;分别在NDV尿囊液中加入终浓度为0.1%~0.5%的甲醛溶液或0.02%~0.2%的 β -丙内酯,充分混匀,分别置4℃灭活48h或37℃灭活9h,制备NDV灭活病毒抗原。

7. 根据权利要求2所述的新城疫抗体阻断检测试纸,其特征在于,HN蛋白重组抗原为利用大肠杆菌或转基因水稻表达纯化的HN重组蛋白。

8. 根据权利要求7所述的新城疫抗体阻断检测试纸,其特征在于,HN蛋白重组抗原的具体制备方法为:

(1) 大肠杆菌表达HN蛋白

根据NDV流行毒株XX-08 HN基因序列合成经大肠杆菌密码子优化的HN基因,并亚克隆入大肠杆菌表达载体pET-28a构建重组表达质粒,将重组质粒pET28a-rHN转化大肠杆菌BL21 (DE3),以1mmol/L IPTG诱导表达HN重组蛋白,表达蛋白经8mol/L尿素变性溶解后经Ni-NTA亲和层析纯化,获得纯度90%的HN表达蛋白,以NDV抗原检测试纸测定其抗原活性,制备HN蛋白重组抗原;

(2) 转基因水稻表达HN蛋白

根据NDV标准毒株F48E8 HN基因序列,合成经水稻密码子优化的HN基因,并相继亚克隆入中间载体pMP3和植物表达载体pCAMBIA1300,构建转基因水稻重组表达质粒,通过农杆菌介导水稻遗传转化,筛选获得HN转基因水稻纯合子株系,NDV抗原检测试纸检测表明HN蛋白在水稻胚乳中高效表达;以镍亲和层析、离子交换层析和凝胶过滤层析对转基因水稻表达蛋白进行纯化,获得纯度95%的HN表达蛋白,以NDV抗原检测试纸测定其抗原活性,制备HN蛋白重组抗原。

9. 根据权利要求2所述的新城疫抗体阻断检测试纸,其特征在于,多肽抗原为抗新城疫病毒单克隆抗体mAb1和mAb2抗原表位多肽与载体蛋白偶联的人工抗原,载体蛋白为牛血清白蛋白BSA,免疫球蛋白IgG,卵清白蛋白OVA或钥孔血蓝蛋白KLH;具体制备方法为:利用多肽合成仪以固相多肽合成方法合成单克隆抗体mAb1和mAb2抗原表位多肽,在多肽N端均加入Cys,用于载体蛋白偶联;将mAb1和mAb2的抗原表位多肽按摩尔比4:1、2:1、1:1、1:2和1:4混合,利用异型双功能试剂SMCC将多肽与牛血清白蛋白、免疫球蛋白、卵清白蛋白或钥孔血蓝蛋白按不同摩尔比进行偶联,获得不同多肽混合比的多肽偶联抗原,以Dot-Blot或NDV抗

原检测试纸测定HN偶联多肽抗原活性,并测定鸡抗NDV血清对胶体金标记抗体的阻断效率,获得最佳多肽配比和多肽/载体蛋白的偶联多肽抗原,制备HN蛋白多肽抗原。

10.根据权利要求1所述的新城疫抗体阻断检测试纸,其特征在于,抗原垫的制备方法为:将玻璃纤维棉切成条状,以含0.1mol/L NaCl、0.2%Tween 20 (v/v) 和0.1% (w/v) 叠氮钠的PBS (pH7.2) 溶液分别将NDV病毒抗原、HN重组抗原和多肽抗原做系列稀释,并以15 μ L/cm将上述NDV检测抗原喷点于玻璃棉,干燥;将抗原垫置塑料袋,加干燥剂室温密闭保存备用;利用吸附不同检测抗原的抗原垫装配试纸,以不同浓度鸡抗NDV阳性血清测定试纸阻断效果,通过对不同抗原及其浓度的组合筛选,获得抗原垫的最佳工作浓度为:病毒抗原4log₂ HA单位/100 μ L,重组抗原200 μ g/mL,多肽抗原100 μ g/mL。

一种新城疫抗体阻断检测试纸

技术领域

[0001] 本发明涉及一种家禽疫病抗体检测器具,特别是涉及一种新城疫抗体阻断检测试纸。

背景技术

[0002] 鸡新城疫(Newcastle disease,ND) 又称亚洲鸡瘟,是由新城疫病毒(Newcastle disease virus,NDV) 引起的一种以呼吸道、消化道粘膜出血为典型病变的高度接触性、急性败血性禽类传染病。除家禽外,至少有200多种鸟可以自然或实验室感染,是危害世界养禽业的最严重的传染病之一。该病自1926年首次报道以来,至今仍在世界各地流行,时有暴发,给养禽业造成了严重的经济损失,世界卫生组织(OIE) 将其列为应呈报疫病,我国将其列为一类动物传染病。我国采用弱毒疫苗预防控制了ND的大规模流行,但ND的流行和发病特点又发生新变化,多表现为非典型和慢性感染,出现了所谓“非典型新城疫”和“温和型新城疫”,同时NDV与禽流感病毒等其它呼吸道病原混合感染也十分普遍,使ND此起彼伏,给养禽业带来了不小的损失,也使新城疫的防治更加困难。NDV为有囊膜、不分节段、单股负链RNA病毒,属于副黏病毒科(Paramyxoviridae) 禽副黏病毒属(Paramyxovirus),其血清型为禽副黏病毒I型(APMV-1),又可分为16个基因型。NDV基因组含有15186、15192或15198个核苷酸,病毒基因组结构模式为3'-NP-P-M-F-HN-L-5',依次编码核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein,NP)、磷蛋白(Phosphoprotein,P)、基质蛋白(Matrix protein,M)、融合蛋白(Fusion protein,F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白(Heamagglutinin-Neuraminidase protein,HN) 和大RNA依赖RNA聚合酶(Large RNA dependent RNA-polymerase,L),其中F和HN蛋白是NDV表面重要的两个囊膜糖蛋白,它们在病毒感染过程中起到重要的作用。NDV病毒毒力主要取决于F前体蛋白部分氨基酸序列,高致病性NDV通常含有C-112R/K-RQ/K/R-R/K-R-F117-N,而低致病性NDV则为C-112G/EK/R-Q-G/E-R-L117-N,世界动物卫生组织将NDV分为嗜内脏型和神经型(高死亡率)、中发型(低死亡率、中度呼吸系统症状)、弱毒型(温和呼吸系统感染、不死亡,疫苗株) 和无症状型(无症状或肠道亚临床感染)。基因I型毒株均为弱毒株,在基因II型病毒中,除弱毒株外还有中等毒力毒株和高致病力的强毒株,而在基因I和II型毒株之后出现的其它7个基因型(III-IX型) NDV均为强毒株。流行病学数据表明,上世纪80年代在我国鸡群中主要流行的NDV毒株为VIIf和VIg亚型,90年代中期我国出现了NDV基因VII型,并且成为我国NDV流行的优势基因型,当前VIIId亚型在我国流行强毒株中已占有绝对优势。

[0003] 目前,我国新城疫的防控仍然采取以疫苗免疫为主的策略,雏鸡母源抗体是影响ND疫苗(特别是弱毒疫苗) 免疫效果的重要因素,对雏鸡母源抗体和免疫抗体水平的监测是制定和优化NDV免疫程序的重要依据;同时,免疫鸡群的血清抗体水平,尤其是中和抗体水平是NDV疫苗免疫评价的重要指标。目前常用NDV抗体检测方法包括血凝抑制试验(HI)、酶联免疫吸附试验(ELISA) 和病毒中和试验(VN)。HI试验是NDV抗体检测的经典方法,可有效评估疫苗免疫抗体水平和免疫保护效果,但血清中的非特异凝集素和非特异抑制素、以及

红细胞和主观判定等均影响HI试验的准确性。间接ELISA具有较高的灵敏性,适于大量的血清学监测,可以标准化而且结果易于分析,但不能区分中和与非中和抗体,无法准确评价免疫保护效果。VN试验是最敏感而特异的中和抗体检测方法,NDV中和抗体水平与免疫保护直接相关,但该技术方法不但费时,操作繁琐,费用昂贵,而且病毒培养必须在III级生物安全实验室(P3)操作,技术和安全措施要求极高,无法实现临床样品的大量、实时检测。因此,虽然上述检测方法可检测NDV抗体水平,但均存在试验操作复杂,耗时长,需要特定的专业技能和仪器设备等,成本昂贵,常限于实验室内进行,很难在基层普及和推广,不适合大批量样本的普查。此外,当前广泛流行的NDV基因型VIIId与我国普遍使用的弱毒疫苗(基因型I和II)在遗传学、免疫反应和保护效力等方面存在较大差异,常用疫苗株LaSota对不同基因型的ND强毒流行株虽能产生临床保护,但不能防止流行株在免疫鸡中的感染复制和排出,而免疫鸡群中ND强毒感染仍然时有发生,同时由于缺乏血清学标志和配套的鉴别诊断方法,其在我国的大规模应用使得通过血凝抑制试验(HI)和酶联免疫吸附试验(ELISA)等抗体检测技术很难区分弱毒免疫和野毒感染,不利于ND的控制和净化。因此研制动物疫病病原和抗体检测胶体试纸产品具有重要意义。

发明内容

[0004] 针对现有技术的不足,本发明的目的是研制适用于家禽新城疫抗体检测与疫苗免疫评价的新城疫抗体阻断检测试纸,本试纸特异、敏感、快捷、简便,易在生产实践中推广应用。

[0005] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0006] 一种新城疫抗体阻断检测试纸,由支撑板、抗原垫、金标垫、检测膜和吸水垫构成,抗原垫吸附新城疫病毒检测抗原,金标垫吸附胶体金标记的抗新城疫病毒单克隆抗体mAb1,检测膜上含有检测线T“|”和质控线C“|”印迹,检测线T为抗新城疫病毒单克隆抗体mAb2或抗新城疫病毒多克隆抗体pAb1印迹“|”,质控线C为兔抗小鼠IgG抗体pAb2或金黄色葡萄球菌SPA印迹“|”。

[0007] 抗新城疫病毒单克隆抗体mAb1具有血凝抑制HI和病毒中和VN活性,特异识别HN蛋白中和抗原表位;单克隆抗体mAb2具有血凝抑制HI活性,特异识别HN蛋白非中和抗原表位;新城疫病毒检测抗原为病毒抗原,HN蛋白重组抗原或多肽抗原。

[0008] 所述试纸是以单克隆抗体阻断模式检测新城疫病毒中和抗体,当检测膜显现两条红色条带“||”,且检测线T显色强度与空白对照相当,为新城疫病毒抗体阴性;显现两条红色条带“||”,但检测线T明显弱于空白对照,为新城疫病毒抗体弱阳性;只显现一条红色条带“|”,为新城疫病毒抗体强阳性。

[0009] 抗新城疫病毒单克隆抗体mAb1和mAb2的制备方法为:

[0010] (1)新城疫病毒免疫抗原的制备

[0011] 以新城疫病毒标准强毒株F48E8经尿囊腔接种9~11日龄SPF鸡胚,36~48h收取尿囊液,差速离心纯化病毒抗原,4℃3000r/min低速离心30min去除杂质,4℃60000r/min超速离心1h,用7mL 0.01mol/L PBS(pH值7.2)重悬沉淀,以血凝试验测定新城疫病毒的HA效价达 2^{-12} 以上;

[0012] (2)抗新城疫病毒单克隆抗体的制备

[0013] (2.1) 杂交瘤细胞株的建立

[0014] 将新城疫病毒免疫抗原免疫小鼠,建立抗新城疫病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株;

[0015] (2.2) 单克隆抗体的制备

[0016] (2.3) 单克隆抗体的鉴定

[0017] (2.3.1) 病毒反应谱

[0018] 用NDV标准毒株、流行毒株和弱毒疫苗株I系、IV系感染鸡胚成纤维细胞或仓鼠肾细胞,以免疫过氧化物酶单层细胞试验测定单克隆抗体阳性克隆与NDV流行毒株的反应性,筛选获得识别NDV标准毒株、流行毒株和弱毒疫苗株的广谱单克隆抗体;

[0019] (2.3.2) 识别病毒蛋白

[0020] 以鸡抗NDV多克隆抗体IgG包被96孔酶标板,转基因水稻表达NDV HN蛋白和F蛋白为检测抗原,以夹心ELISA检测不同株单克隆抗体阳性克隆识别的病毒蛋白,筛选获得特异识别HN蛋白单克隆抗体和特异识别F蛋白的单克隆抗体;

[0021] (2.3.3) 血凝抑制(HI)活性

[0022] 以免疫过氧化物酶单层细胞试验测定单克隆抗体腹水的单抗效价,以血凝抑制试验测定单克隆抗体腹水的HI活性,筛选获得具有血凝抑制活性的单克隆抗体,作为单克隆抗体mAb2,用于检测线T印迹;

[0023] (2.3.4) 病毒中和(VN)活性

[0024] 以病毒中和试验测定单克隆抗体腹水对不同NDV毒株的中和活性,筛选获得具有病毒中和活性单克隆抗体,作为单克隆抗体mAb1,用于胶体金标记;

[0025] (2.3.5) 单克隆抗体亚型鉴定

[0026] 利用单克隆抗体亚型鉴定试剂盒测定抗NDV单克隆抗体的免疫球蛋白亚型;

[0027] (2.3.6) 抗原表位分析

[0028] 利用重叠合成多肽对抗NDV单克隆抗体识别的抗原表位进行分析;

[0029] (2.4) 单克隆抗体的纯化

[0030] 以辛酸-硫酸铵法从小鼠腹水中纯化单抗IgG。

[0031] 病毒抗原为经甲醛或 β -丙内酯BPL灭活的新城疫病毒尿囊液。

[0032] 病毒抗原的具体制备方法为:以新城疫病毒疫苗株LaSota经尿囊腔接种9~11日龄SPF鸡胚,36~120h收取鸡胚尿囊液,4℃3000r/min低速离心30min,取上清,以血凝试验测定新城疫病毒的HA效价达 2^{-12} 以上;分别在NDV尿囊液中加入终浓度为0.1%~0.5%的甲醛溶液或0.02%~0.2%的 β -丙内酯,充分混匀,分别置4℃灭活48h或37℃灭活9h,制备NDV灭活病毒抗原。

[0033] HN蛋白重组抗原为利用大肠杆菌或转基因水稻表达纯化的HN重组蛋白。

[0034] HN蛋白重组抗原的具体制备方法为:

[0035] (1) 大肠杆菌表达HN蛋白

[0036] 根据NDV流行毒株XX-08HN基因序列合成经大肠杆菌密码子优化的HN基因,并亚克隆入大肠杆菌表达载体pET-28a构建重组表达质粒,将重组质粒pET28a-rHN转化大肠杆菌BL21(DE3),以1mmol/L IPTG诱导表达HN重组蛋白,表达蛋白经8mol/L尿素变性溶解后经Ni-NTA亲和层析纯化,获得纯度90%的HN表达蛋白,以NDV抗原检测试纸测定其抗原活性,制备HN蛋白重组抗原;

[0037] (2) 转基因水稻表达HN蛋白

[0038] 根据NDV标准毒株F48E8HN基因序列,合成经水稻密码子优化的HN基因,并相继亚克隆入中间载体pMP3和植物表达载体pCambia1300,构建转基因水稻重组表达质粒,通过农杆菌介导水稻遗传转化,筛选获得HN转基因水稻纯合子株系,NDV抗原检测试纸检测表明HN蛋白在水稻胚乳中高效表达;以镍亲和层析、离子交换层析和凝胶过滤层析对转基因水稻表达蛋白进行纯化,获得纯度95%的HN表达蛋白,以NDV抗原检测试纸测定其抗原活性,制备HN蛋白重组抗原。

[0039] 多肽抗原为抗新城疫病毒单克隆抗体mAb1和mAb2抗原表位多肽与载体蛋白偶联的人工抗原,载体蛋白为牛血清白蛋白BSA,免疫球蛋白IgG,卵清白蛋白OVA或钥孔血蓝蛋白KLH;具体制备方法为:利用多肽合成仪以固相多肽合成方法合成单克隆抗体mAb1和mAb2抗原表位多肽,在多肽N端均加入Cys,用于载体蛋白偶联;将mAb1和mAb2的抗原表位多肽按摩尔比4:1、2:1、1:1、1:2和1:4混合,利用异型双功能试剂SMCC将多肽与牛血清白蛋白、免疫球蛋白、卵清白蛋白或钥孔血蓝蛋白按不同摩尔比进行偶联,获得不同多肽混合比的多肽偶联抗原,以Dot-Blot或NDV抗原检测试纸测定HN偶联多肽抗原活性,并测定鸡抗NDV血清对胶体金标记抗体的阻断效率,获得最佳多肽配比和多肽/载体蛋白的偶联多肽抗原,制备HN蛋白多肽抗原。

[0040] 抗原垫的制备方法为:将玻璃纤维棉切成条状,以含0.1mol/L NaCl、0.2% Tween 20 (v/v) 和0.1% (w/v) 叠氮钠的PBS (pH 7.2) 溶液分别将NDV病毒抗原、HN重组抗原和多肽抗原做系列稀释,并以15 μ L/cm将上述NDV检测抗原喷点于玻璃棉,干燥;将抗原垫置塑料袋,加干燥剂室温密闭保存备用;利用吸附不同检测抗原的抗原垫装配试纸,以不同浓度鸡抗NDV阳性血清测定试纸阻断效果,通过对不同抗原及其浓度的组合筛选,获得抗原垫的最佳工作浓度为:病毒抗原4log₂HA单位/100 μ L,重组抗原200 μ g/mL,多肽抗原100 μ g/mL。

[0041] 以新城疫病毒标准强毒F48E8株为免疫抗原,通过杂交瘤细胞技术生产鉴定抗新城疫病毒单克隆抗体,利用免疫过氧化物酶单层细胞试验(IPMA)、血凝抑制试验(HI)和病毒中和试验(VN)筛选新城疫病毒的广谱中和单克隆抗体,以叠加酶联免疫吸附试验(ELISA)筛选识别不同抗原表位的单克隆抗体,以合成多肽鉴定单克隆抗体识别的抗原表位。筛选鉴定的单克隆抗体mAb1具有血凝抑制(HI)和病毒中和(VN)活性,特异识别HN蛋白中和抗原表位,用于胶体金标记;筛选鉴定的单克隆抗体mAb2具有血凝抑制(HI)活性,特异识别HN蛋白非中和抗原表位,或以新城疫活疫苗和灭活疫苗联合免疫的抗新城疫病毒多克隆抗体pAb1,可用于检测线T印迹;以小鼠IgG为免疫抗原制备兔抗小鼠IgG多克隆抗体pAb2,pAb2或金黄色葡萄球菌SPA可用于质控线C印迹;以 β -丙内脂灭活新城疫病毒尿囊液制备的病毒抗原,大肠杆菌或转基因水稻表达纯化HN蛋白制备的重组抗原,单克隆抗体mAb1和mAb2抗原表位多肽与载体蛋白偶联制备的多肽抗原,可用于抗原垫。

[0042] 本发明有益的积极效果:

[0043] 新城疫抗体阻断检测试纸实现了新城疫病毒中和抗体的快速检测,可实现对新城疫母源抗体和免疫抗体水平的实时监测,以及疫苗免疫效果的免疫评价,并且操作简单,人人都可操作,能较好满足不同层次人员的需要,如疫病监测、海关检疫、卫生防疫、集约化养殖到个体养殖等,易于大范围推广应用,具有广阔的市场前景和较大的经济、社会效益。检测试纸条具有下列各项优点:

[0044] (1) 免疫保护评价。传统试纸以间接法检测抗体,即试纸以显示“||”为阳性,以显示“|”为阴性,只能检测总的抗体水平,无法检测中和抗体水平;新城疫抗体阻断检测试纸基于广谱中和单克隆抗体阻断模式对新城疫病毒中和抗体进行检测,即试纸以显示“|”为阳性,以显示“||”为阴性,可有效检测母源抗体或免疫抗体的中和抗体水平,替代经典血凝抑制(HI)实现对母源抗体和疫苗免疫的免疫保护评价。

[0045] (2) 特异性强,敏感性高。新城疫抗体阻断检测试纸利用特异性检测抗原和广谱中和单克隆抗体以抗体阻断模式制备而成,单克隆抗体的特异性强和敏感性高,金标抗体中金颗粒与抗体分子之间无共价键形成,二者通过异性电荷间的范德华力相结合,胶体金对标记抗体的反应性影响很小,且具有较高的标记率。因此,抗体阻断检测试纸具有较高的特异性和敏感性,可检出4HI单位中和抗体。

[0046] (3) 操作简便快速。使用抗体阻断检测试纸时无需任何其它试剂,待检样品加入试纸加样孔,5~10min即可判定检测结果,而常规HI和ELISA不仅操作复杂,而且检测时间需1~2h,因此显著优于HI和ELISA试验。

[0047] (4) 显示检测结果形象、直观准确。抗体阻断检测试纸以单克隆抗体阻断模式检测新城疫中和抗体,以在检测膜上显示红色“||”和“|”条带作为中和抗体检测的阴性和阳性标记,即显现两条红色条带“||”,且检测线T显色强度与空白对照相当为新城疫病毒抗体阴性,表示被检测血清样品无新城疫病毒抗体;显现两条红色条带“||”,但检测线T明显弱于空白对照为新城疫病毒抗体弱阳性,表示被检血清样品含有低水平新城疫中和抗体;只显现一条红色条带“|”为新城疫病毒抗体强阳性,表示被检血清样品含有高水平新城疫中和抗体,结果判定形象、直观、准确,简单明了,不易出现假阴性和假阳性误判。

[0048] (5) 成本低,投资少。使用抗体阻断检测试纸,不需另配仪器设备及其它试剂,使现场检测一步到位,成本低廉,投资少,见效快。

附图说明

[0049] 图1为单克隆抗体9C1的病毒中和试验。

[0050] 图2为单克隆抗体的亚型鉴定。

[0051] 图3为单克隆抗体的表位多肽ELISA鉴定。

[0052] 图4为单克隆抗体5F2的表位多肽Dot-Blot鉴定。

[0053] 图5为大肠杆菌表达HN蛋白的纯化。图中,M:蛋白Marker;1:H表达蛋白;2~5:纯化HN表达蛋白。

[0054] 图6为新城疫抗体阻断检测试纸的剖视结构示意图。

[0055] 图7是新城疫抗体阻断检测试纸卡的俯视结构示意图。图中,1:支撑板,2:抗原垫,3:金标垫,4:检测膜,5:吸水垫,6:检测线T印迹,7:质控线C印迹,8:试纸卡,9:加样孔。

[0056] 图8为新城疫抗体阻断检测试纸的敏感性试验结果。

[0057] 图9为新城疫抗体阻断检测试纸的特异性试验结果。

具体实施方式

[0058] 以下结合实施例对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0059] 新城疫抗体阻断检测试纸可广泛应用于多种家禽(如鸡、鸭、鹅、鸽等)和鸟类新城

疫中和抗体水平监测和免疫评价。制备新城疫抗体阻断检测试纸,首先需制备新城疫病毒免疫抗原,进而制备抗新城疫病毒多克隆抗体和单克隆抗体,并筛选新城疫病毒广谱中和单克隆抗体,鉴定单抗识别中和抗原表位,识别新城疫病毒HN蛋白的中和单克隆抗体mAb1用于制备胶体金标记物,识别新城疫病毒不同抗原表位的单克隆抗体mAb2或新城疫病毒多克隆抗体pAb1用于印制检测线T印迹“|”,其次需制备兔抗小鼠IgG抗体pAb2或金黄色葡萄球菌SPA,用于印制质控线C印迹“|”,最后需制备经灭活的新城疫病毒抗原、HN蛋白重组抗原或表位多肽抗原,用于制备抗原垫。

[0060] (1) 新城疫病毒免疫抗原的制备

[0061] 以新城疫病毒标准强毒株F48E8经尿囊腔接种9~11日龄SPF鸡胚,36~48h收取尿囊液,差速离心纯化病毒抗原,4℃3000r/min低速离心30min去除杂质,4℃60000r/min超速离心1h,用7mL 0.01mol/L PBS (pH值7.2) 重悬沉淀。以血凝试验 (HA) 测定新城疫病毒的HA效价达 2^{-12} 以上。

[0062] (2) 抗新城疫病毒单克隆抗体的制备

[0063] (2.1) 杂交瘤细胞株的建立

[0064] 将新城疫病毒免疫抗原与弗氏免疫佐剂等量混合,充分乳化,以50~100μg/只免疫Balb/c系小鼠3次,每次间隔15~30d;第3次加强免疫后3~4d,将免疫小鼠眼球放血,拉颈致死,于75% (v/v) 酒精浸泡5~10min,无菌取其脾细胞;剪碎并经100目尼龙网过滤,1000r/min离心10min,收集脾细胞;将 1×10^8 个的脾细胞与 $2 \sim 5 \times 10^7$ 个的SP2/0骨髓瘤细胞混合,1000r/min离心10min,弃上清,在37℃的水浴中将0.7~1mL的40%~50% (w/v) PEG 4000 (pH8.5~pH 9.0) 缓缓加入细胞,温育1min后,缓慢加入无血清1640培养基15mL,以终止PEG的作用,37℃水浴5~10min,1000r/min离心10min,弃上清,将细胞重悬于HAT选择培养基中(1×10^5 个/mL),并加入96孔培养板(100~200μL/孔),置37℃5%CO₂培养箱中培养。培养7~10d后,取杂交瘤细胞培养上清以酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和免疫过氧化物酶单层细胞试验 (IPMA) 筛选阳性杂交瘤细胞。以新城疫病毒标准强毒F48E8株感染鸡胚成纤维细胞 (CEF) 或仓鼠肾细胞 (BHK-21) 细胞,经甲醇固定后,5% (w/v) 脱脂奶37℃封闭1h;加待检细胞培养上清50μL/孔,设HAT培养基和小鼠免疫血清为阴性和阳性对照;加1:500辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗小鼠IgG抗体 (50μL/孔),37℃作用30min;每步反应后均用含0.05% (w/v) Tween-20的PBS充分洗涤;以底物AEC室温显色10~20min,用水冲洗中止显色后,在显微镜下观察显色结果。获得强阳性杂交瘤细胞克隆94个,经连续3次有限稀释克隆化,建立抗新城疫病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株16株。

[0065] (2.2) 单克隆抗体的制备

[0066] 以体内诱生腹水制备单克隆抗体腹水16株。取经降殖烷或液体石蜡致敏的经产Balb/c小鼠,腹腔注射对数生长期的杂交瘤细胞 10^7 个/只,7~10d后抽取腹水,离心后取上清,分装,冻存。

[0067] (2.3) 单克隆抗体的鉴定

[0068] (2.3.1) 病毒反应谱

[0069] 用NDV标准毒株 (F48E8)、流行毒株 (基因VIIId) 和弱毒疫苗株I系 (Mukteswar株)、IV系 (Lasota株) 感染鸡胚成纤维细胞 (CEF) 或仓鼠肾细胞 (BHK-21),以免疫过氧化物酶单层细胞试验 (IPMA) 测定单克隆抗体阳性克隆与NDV毒株的反应性,筛选获得识别NDV标准毒

株、流行毒株和弱毒疫苗株的广谱单克隆抗体25株,其病毒反应谱见表1。

[0070] 表1单克隆抗体的NDV反应谱 (IPMA)

[0071]

序号	mAbs	NDV 毒株								BHK-21
		G1	ND1	ND6	ND7	XX-08	I 系	LaSota	F48E8	
1	1F1	+	-	+	+	+	+	+	+	-
2	1G6	++	++	++	++	++	++	++	+	-
3	1G7	++	++	++	++	++	++	++	±	-
4	2D3	+	+	++	++	+	++	++	++	-
5	3C2	++	+	+	++	+	+	-	±	-
6	3D8	++	++	++	++	++	++	++	±	-
7	3C10	+	+	+	+	+	+	-	+	-
8	3D10	+	+	+	+	+	++	++	++	-
9	4D2	++	++	++	++	++	++	++	++	-
10	5D6	++	+	+	++	+	++	++	++	-
11	5D7	++	+	+	+	+	++	++	±	-
12	5F2	++	-	++	++	++	++	++	++	-
13	8D5	+	+	+	++	+	±	±	±	-
14	8F4	++	++	++	++	++	++	++	±	-
15	9B10	++	++	++	++	++	++	++	+	-
16	9C1	++	+	++	++	+	+	+	+	-
17	11A3	++	+	+	+	+	+	+	+	-
18	11B7	++	++	++	++	++	++	++	+	-
19	11D1	++	++	++	+	++	++	++	±	-
20	12C9	++	+	+	+	++	++	++	+	-
21	13A5	++	++	+	++	++	++	++	+	-
22	13A6	++	++	+	++	++	++	++	+	-
23	13G8	++	++	+	++	++	++	+	+	-
24	16G2	++	++	+	++	++	++	++	+	-
[0072]										
25	16H8	++	+	+	++	++	++	++	+	-

[0073] (2.3.2) 识别病毒蛋白

[0074] 以鸡抗NDV多克隆抗体IgG包被96孔酶标板,转基因水稻表达NDV HN蛋白和F蛋白为检测抗原,以夹心ELISA检测株单克隆抗体阳性克隆识别的病毒蛋白,筛选获得特异识别HN蛋白单克隆抗体15株,识别F蛋白22株(表2)。

[0075] 表2单克隆抗体识别的病毒蛋白(夹心ELISA)

[0076]

序号	mAbs	病毒蛋白		序号	mAbs	病毒蛋白		序号	mAbs	病毒蛋白	
		HN	F			HN	F			HN	F
1	1G6	+	-	1	1B3	-	+	12	11D1	-	+
2	1G7	+	-	2	2A5	-	+	13	11D3	-	+
3	3G5	+	-	3	2C1	-	+	14	11F2	-	+
4	4D2	+	-	4	3D10	-	+	15	12F8	-	+
5	5D6	+	-	5	3C2	-	+	16	13A5	-	+
6	5F2	+	-	6	3C10	-	+	17	14F11	-	+
7	9C1	+	-	7	4B4	-	+	18	17F10	-	+
8	14A6	+	-	8	4B8	-	+	19	17H10	-	+
9	15C4	+	-	9	5E10	-	+	20	19F5	-	+
10	15F3	+	-	10	7H12	-	+	21	20F3	-	+
11	15H6	+	-	11	9B6	-	+	22	20H10	-	+
12	16C9	+	-								
13	16G2	+	-								
14	18E3	+	-								
15	19E4	+	-								

[0077] (2.3.3) 血凝抑制 (HI) 活性

[0078] 以免疫过氧化物酶单层细胞试验 (IPMA) 测定16株单克隆抗体腹水的单抗效价, 其对NDV标准毒株F48E8和疫苗株LaSota的IPMA效价在 $0.5 \times 10^{-2} \sim 2.56 \times 10^{-5}$ 之间。以血凝抑制试验 (HI) 测定单克隆抗体腹水的HI活性, 筛选获得具有血凝抑制活性单克隆抗体6株 (1G6、2C1、3G5、4D2、5F2和9C1), 其HI效价在 $6 \sim 12 \log 2$ (F48E8) 和 $9 \sim 11 \log 2$ (LaSota) 之间 (表3和表4), 因此选择具有良好HI活性的广谱单克隆抗体1G6和4D2为单克隆抗体mAb2, 用于检测线T印迹。

[0079] 表3单克隆抗体的IPMA和HI效价

mAbs	IPMA		HI	
	F48E8	LaSota	F48E8	LaSota
1B3	1.28×10^{-4}	1.28×10^{-4}	0	0
1G6	1.28×10^{-3}	1.28×10^{-3}	$6 \log 2$	$10 \log 2$
2A5	0.5×10^{-2}	0.5×10^{-2}	0	0
2C1	1.28×10^{-3}	0	$12 \log 2$	0

[0080]

[0081]	3C2	2.56×10^{-4}	1.28×10^{-4}	0	0
	3D10	2.56×10^{-5}	2.56×10^{-5}	0	0
	4D2	1.28×10^{-5}	1.28×10^{-5}	$9 \log 2$	$9 \log 2$
	5D6	1.28×10^{-4}	1.28×10^{-4}	0	0
	5D7	1.28×10^{-4}	1.28×10^{-4}	0	0
	5E10	1.28×10^{-4}	2×10^{-4}	0	0
	5F2	3.2×10^{-4}	4×10^{-5}	$12 \log 2$	$11 \log 2$
	13A5	1.28×10^{-5}	1.28×10^{-5}	0	0
	15H6	1.28×10^{-4}	0.5×10^{-2}	0	0
	16G2	5.12×10^{-4}	0.5×10^{-2}	0	0
	3G5	1.28×10^{-4}	0	$10 \log 2$	0
	9C1	1.28×10^{-4}	1.28×10^{-4}	$9 \log 2$	$9 \log 2$

[0082] 表4单克隆抗体的NDV反应谱(IPMA)和病毒中和活性(VN)

[0083]	NDV mAbs	ND1	ND6	XX08	Clone30	I 系	LaSota	F48E8
	1B3	+/- *	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	1G6	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	2A5	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	2C1	-	-	-	-	-	-	+/NT**
	3C2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	3D10	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	3G5	+/-	+/-	+/-	-/-	±/-	-/-	+/-
	4D2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	5D6	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	5D7	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	5E10	+/-	+/-	+/-	+/-	±/-	+/-	+/-
	5F2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+
	9C1	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	13A5	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+
	15H6	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
16G2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	±/-	

[0084] *IPMA/VN; **Not Tested.

[0085] (2.3.4) 病毒中和 (VN) 活性

[0086] 以病毒中和 (VN) 试验测定16株单克隆抗体腹水对不同NDV毒株的中和活性,筛选获得具有3株病毒中和活性单克隆抗体 (5F2、9C1和13A5) (表3), 其中单克隆抗体9C1对NDV标准毒株 (F48E8)、流行毒株 (基因型VIIId) 和疫苗毒株 (LaSota、Clone 30和I系) 均显示良好中和活性,其病毒中和效价在1:400~1:3200之间 (图1、表5), 因此选择9C1为单克隆抗体 mAb1, 用于胶体金标记。

[0087] 表5单克隆抗体的病毒中和 (VN) 效价

NDV	mAbs		
	9C1	5F2	13A5
F48E8	1:1600	1:3200	1:50

[0089]	XX-8	1:1600	-	1:100
	ND1	1:3200	-	1:25
	ND7	1:1600	-	-
	I 系	1:800	1:800	1:3200
	Lasota	1:400	-	-
	Clone 30	1:400	-	-

[0090] (2.3.5) 单克隆抗体亚型鉴定

[0091] 利用单克隆抗体亚型鉴定试剂盒分别测定NDV单克隆抗体的免疫球蛋白亚型,结果显示NDV中和单抗5F2和9C1均为IgG1亚型,区分强弱毒株单抗3G5和广谱识别单抗4D2均为IgG2b亚型(图2)。

[0092] (2.3.6) 抗原表位分析

[0093] 利用重叠合成多肽(Overlapping peptide)对NDV单克隆抗体识别的抗原表位进行分析。根据NDV标准毒株F48E8HN蛋白氨基酸序列(GenBank:ACK57499.1)及其晶体结构(PDB ID code 3T1E),设计合成16-mer HN多肽(10-mer overlapping)92条,在多肽N端均加入Cys,用于载体蛋白偶联。利用异型双功能试剂SMCC将HN多肽与牛血清白蛋白(BSA),猪、牛、羊、兔等免疫球蛋白(IgG)、卵清白蛋白(OVA)或钥孔血蓝蛋白(KLH)等载体蛋白偶联,以ELISA或Dot-Blot测定单克隆抗体与HN偶联多肽的反应,分析鉴定NDV单克隆抗体识别的抗原表位,筛选获得单克隆抗体5F2识别的抗原表位多肽为“³⁴²TCPDEQDYQIRMAKSS³⁵⁷”,而单克隆抗体3G5、4D2和9C1未发现特异识别的抗原表位多肽(图3和图4),表明上述单克隆抗体识别HN蛋白构象抗原表位,需利用噬菌体肽库淘选其识别的表位基序,或通过截短表达HN蛋白分析其识别抗原区域,或通过解析单克隆抗体与HN蛋白复合物晶体结构,精确定位其抗原表位。

[0094] (2.4) 单克隆抗体的纯化

[0095] 以辛酸-硫酸铵法从小鼠腹水中纯化单抗IgG。取1mL小鼠腹水,加入2mL 0.06mol/L乙酸钠缓冲液(pH 5.0),以0.1mol/L HCl调至pH 4.5;于室温搅拌下逐滴加入33μL辛酸,4℃静置2h,15000r/min离心30min,弃沉淀;在离心上清中加入1/10体积0.01mol/L PBS(pH7.4),以0.1mol/L NaOH调至pH 7.4;于冰浴条件下加入饱和硫酸铵至终浓度45%,4℃静置2h,10000r/min离心30min,弃上清;以适量PBS重悬沉淀,对PBS透析过夜,换液3次。以分光光度计法或考马斯亮蓝染色法(Bradford法)测定纯化单克隆抗体IgG的蛋白含量在1mg/mL以上,以免疫过氧化物酶单层细胞试验(IPMA)测定小鼠腹水和纯化IgG的抗体效价在1:1000以上,分装,冻存。

[0096] (3) 抗新城疫病毒多克隆抗体的制备。

[0097] 以50~100μg/kg体重的新城疫病毒免疫抗原加免疫佐剂经皮下和肌肉注射免疫SPF鸡3~4次,末次免疫10天后,静脉采血,以IPMA测定其血清抗体效价在1:1000以上时,心脏采血或颈动脉放血,收集高免血清,以无水硫酸钠(Na₂SO₄)提取免疫家禽血清IgG,取1份免疫血清加2份0.01mol/L PBS(pH7.2)混合,加入无水Na₂SO₄至终浓度18%,37℃水浴30min,4000r/min离心20min,弃上清,以适量PBS(pH7.2)重悬沉淀,加终浓度16%的Na₂SO₄,37℃沉淀30min,4000r/min离心20min,弃上清,再以适量PBS(pH7.2)重悬沉淀,以终浓度14%的Na₂SO₄沉淀,4000r/min离心20min,弃上清,以适量PBS(pH7.2)重悬沉淀,对PBS

(pH7.2)过夜透析,换液2~3次,测定抗体效价和蛋白浓度(10~20mg/mL),所制备抗新城疫病毒多克隆抗体pAb1可用于检测线T印迹。

[0098] (4) 兔抗小鼠IgG多克隆抗体的制备

[0099] 以纯化小鼠IgG免疫2.0kg左右健康新西兰兔,首次免疫以弗氏完全佐剂乳化抗原,皮下多点注射50 μ g/只,共免疫3次,每次加强免疫间隔3周,以弗氏不完全佐剂乳化抗原肌肉注射,最后一次加强免疫2周后,以琼脂扩散试验(AGP)测定免疫血清抗体效价高于1:40时,采集高免兔全血,分离血清,以辛酸-硫酸铵法纯化兔抗小鼠IgG,方法同(2.4)单抗纯化,辛酸用量为45 μ L/mL血清,测定抗体效价和蛋白浓度(10~20mg/mL),所制备兔抗小鼠IgG多克隆抗体pAb2可用于质控线C印迹。

[0100] (5) 检测抗原的制备

[0101] (5.1) 病毒抗原

[0102] 以新城疫病毒疫苗株LaSota经尿囊腔接种9~11日龄SPF鸡胚,36~120h收取鸡胚尿囊液,4℃3000r/min低速离心30min,取上清,以血凝试验(HA)测定新城疫病毒的HA效价达 2^{-12} 以上。分别在NDV尿囊液中加入终浓度为0.1%~0.5%的甲醛溶液或0.02%~0.2%的 β -丙内酯(BPL),充分混匀,分别置4℃灭活48h或37℃灭活9h,取灭活尿囊液接种9~11日龄SPF鸡胚检测病毒是否完全灭活,HA试验测定灭活病毒HA效价。通过病毒灭活试验和HA试验检测,确定以终浓度0.1%甲醛溶液4℃灭活48h或0.02% β -丙内酯(BPL)37℃灭活9h可完全灭活病毒,并保证HA效价与灭活前保持一致,以NDV抗原检测试纸测定其抗原活性,制备NDV灭活病毒抗原。

[0103] (5.2) HN蛋白重组抗原

[0104] (5.2.1) 大肠杆菌表达HN蛋白

[0105] 根据NDV流行毒株XX-08HN基因序列合成经大肠杆菌密码子优化的HN基因,并亚克隆入大肠杆菌表达载体pET-28a构建重组表达质粒,将重组质粒pET28a-rHN转化大肠杆菌BL21(DE3),以1mmol/L IPTG诱导表达HN重组蛋白,表达蛋白经8mol/L尿素变性溶解后经Ni-NTA亲和层析纯化,获得纯度90%的HN表达蛋白(图5),以NDV抗原检测试纸测定其抗原活性,制备HN蛋白重组抗原。

[0106] (5.2.2) 转基因水稻表达HN蛋白

[0107] 根据NDV标准毒株F48E8HN基因序列(GenBank:FJ436302.1),合成经水稻密码子优化的HN基因,并相继亚克隆入中间载体pMP3和植物表达载体pCAMBIA1300,构建转基因水稻重组表达质粒,通过农杆菌介导水稻遗传转化,筛选获得HN转基因水稻纯合子株系,NDV抗原检测试纸检测表明HN蛋白在水稻胚乳中高效表达。以镍亲和层析、离子交换层析和凝胶过滤层析等对转基因水稻表达蛋白进行纯化,获得纯度95%的HN表达蛋白,以NDV抗原检测试纸测定其抗原活性,制备HN蛋白重组抗原。

[0108] (5.3) 多肽抗原

[0109] 利用多肽合成仪以固相多肽合成方法合成单克隆抗体mAb1和mAb2抗原表位多肽,在多肽N端均加入Cys,用于载体蛋白偶联。将mAb1和mAb2的抗原表位多肽按摩尔比4:1、2:1、1:1、1:2和1:4等不同比例混合,利用异型双功能试剂SMCC将多肽与牛血清白蛋白(BSA),猪、牛、羊、兔等免疫球蛋白(IgG)、卵清白蛋白(OVA)或钥孔血蓝蛋白(KLH)等载体蛋白按不同摩尔比(10:1、5:1、2:1)进行偶联,获得不同多肽混合比的多肽偶联抗原,以Dot-Blot或

NDV抗原检测试纸测定HN偶联多肽抗原活性,并测定鸡抗NDV血清对胶体金标记抗体的阻断效率,获得最佳多肽配比(1:2)和多肽/载体蛋白(5:1)的偶联多肽抗原,制备HN蛋白多肽抗原。

[0110] (6) 单克隆抗体的胶体金标记

[0111] (6.1) 胶体金的制备

[0112] 取100mL超纯水置于500mL洁净的锥形瓶,加入1mL 1% (w/v) 氯金酸煮沸;在搅拌状态下迅速加入新鲜配制的1mL 1% (w/v) 柠檬酸钠溶液,煮沸约3min至溶液颜色由黄色变为紫红色,继续煮沸2min;待溶液冷却至室温,补超纯水至100mL,以0.2mol/L K_2CO_3 调pH至9.0,4℃避光可保存数月。

[0113] (6.2) 最适标记蛋白浓度测定

[0114] 取待标记抗新城疫病毒单抗IgG对20mmol/L硼酸钠溶液(pH 8.0) 4℃过夜透析。在微孔板中以25μL超纯水1:2、1:4、1:8……倍比稀释待标记新城疫病毒单抗;各孔加入125μL胶体金溶液,室温静置5min;加入125μL 1mol/L NaCl溶液;各孔颜色随蛋白浓度的降低而由红色变为蓝色。以颜色未变蓝的单抗最高稀释度的蛋白浓度为胶体金最适标记浓度,胶体金标记时,蛋白浓度增加20%。

[0115] (6.3) 单克隆抗体的胶体金标记

[0116] 取2mL最适蛋白浓度的待标记单抗IgG,加入10mL胶体金溶液(pH 9.0),迅速混匀,室温作用10~15min;加入1/10体积含10% (w/v) 牛血清白蛋白(BSA)的20mmol/L硼酸钠溶液,迅速混匀,室温作用10~15min;4℃15000r/min离心30min,小心移去上清;以含1% (w/v) BSA的20mmol/L硼酸钠溶液重悬胶体金,同上离心,弃上清;重复洗涤1次,以1mL含1% (w/v) BSA的20mmol/L硼酸钠溶液重悬胶体金,4℃保存备用。

[0117] (7) 抗原垫的制备

[0118] 将玻璃纤维棉(Millipore C048)按规格切成15mm×300mm的条状,以含0.1mol/L NaCl、0.2% Tween 20 (v/v) 和0.1% (w/v) 叠氮钠的PBS (pH 7.2) 溶液分别将NDV病毒抗原、HN重组抗原和多肽抗原做系列稀释,利用Airjet Quanti 3000以15μL/cm将NDV检测抗原喷点于玻璃棉,置于50℃干燥箱干燥30min;将抗原垫置于塑料袋,加干燥剂室温密闭保存备用。利用吸附不同检测抗原(病毒抗原、重组抗原和多肽抗原)的抗原垫装配试纸,以不同浓度鸡抗NDV阳性血清测定试纸阻断效果,通过对不同抗原及其浓度的组合筛选,获得抗原垫的最佳工作浓度为:病毒抗原 $4 \log_{10}$ HA单位/100μL,重组抗原200μg/mL,多肽抗原100μg/mL。

[0119] (8) 金标垫的制备

[0120] 将玻璃棉切成1.5cm×30cm的长条,置于XYZ 3000喷点仪平台上,并以压条固定;取1mL胶体金标记物加入2mL含2% (w/v) BSA、3% (w/v) 蔗糖、0.6mol/L NaCl、0.2% Tween20 (v/v) 和0.1% (w/v) 叠氮钠的20mmol/L硼酸钠溶液(pH 8.0);利用Airjet Quanti 3000以15μL/cm将抗胶体金标记物溶液喷点于玻璃棉,置于50℃干燥箱干燥30min;将胶金垫置塑料袋,加干燥剂4℃密闭保存备用。

[0121] (9) 检测膜的制备

[0122] 将2.0cm×30cm的Millipore SHF1800420硝酸纤维素膜(NC)置于XYZ 3000喷点仪平台上,并以压条固定;用PBS (pH 7.2) 将特异识别新城疫病毒的广谱单克隆抗体mAb2或多克隆抗体pAb1和兔抗鼠IgG或SPA稀释至1mg/mL,并分别放于贮存池;利用Biojet

Quanti3000以1 μ L/cm分别将单克隆抗体mAb2或多克隆抗体pAb1和兔抗鼠IgG或SPA喷点于检测膜中央,形成检测线T和质控线C印迹,检测线与质控线相距0.5cm;置于42℃干燥箱30min或室温自然干燥;将检测膜置塑料袋,加干燥剂4℃密闭保存备用。

[0123] (10) 吸水垫的制备

[0124] 将吸水滤纸切成18mm \times 300mm条状,制备吸水垫,室温保存备用。

[0125] (11) 支撑板的制备

[0126] 将双面胶贴于PVC支撑板,切成7.5cm \times 30cm的长板,制备支撑板。

[0127] (12) 试纸的组装

[0128] 分别将检测膜、金标垫、抗原垫和吸水垫依次粘贴于支撑板上,组装成检测试纸:将硝酸纤维素检测膜平贴于75mm \times 300mm支撑板的中央,两端边距各为21mm;将8mm \times 300mm的金标垫平贴于检测膜检测线的下方,重叠检测膜2mm,然后均匀平压;将15mm \times 300mm的抗原垫平贴于胶体金抗原棉的下方,重叠胶体金抗原棉下端2mm;将18mm \times 300mm吸水滤纸平放于检测膜质控线的一端,重叠检测膜上端2mm。

[0129] (13) 切割和包装

[0130] 将组装好的半成品放入CM4000切割机中进行切割,规格为2.8mm \times 60mm,显色区应平整无压痕,有两条隐形线,分别是检测线(T线)、质控线(C线),靠近样品端的为T线,靠近手柄端的为C线。切割好的试纸被装入预先制备好的试纸卡中,并用压壳机封好。制成的试纸卡用铝箔袋包装好,封口机封口后打上日期和批次,室温保存备用。

[0131] (14) 新城疫抗体阻断检测试纸的实施结构

[0132] 参见图6、7,1为支撑板用不吸水薄片条,实施中可采用塑胶薄片条或采用不吸水的硬质纸片材,反应试剂载体吸附层由抗原垫2、金标垫3、检测膜4和吸水垫5组合而成,依次粘贴在支撑板1上;其中抗原垫为吸附检测抗原的玻璃纤维棉,检测抗原可用灭活的新城疫病毒、HN重组蛋白或抗原表位多肽,金标垫为吸附胶体金标记的新城疫病毒广谱中和单克隆抗体mAb1的金标玻璃纤维棉,可采用精制玻璃纤维棉,检测膜实施中可采用硝酸纤维素膜,手柄端的吸水垫采用吸水纸,如滤纸或其它吸水纸均可,试纸条总长8cm,宽度0.4cm,检测线T印迹6为用特异识别新城疫病毒不同抗原表位的单克隆抗体mAb2或新城疫病毒多克隆抗体pAb1在硝酸纤维素膜上印制的检测线印迹“|”,质控线C印迹7为兔抗小鼠IgG多克隆抗体pAb2或金黄色葡萄球菌SPA在硝酸纤维素膜上印制的质控线印迹|”,在检测膜上的检测线印迹和质控线印迹组合排列为“||”,8为试纸卡,在试纸样品端有加样孔9。

[0133] (15) 新城疫抗体阻断检测试纸实施检测反应原理

[0134] 当待检样品加入新城疫抗体阻断检测试纸加样孔后,待检溶液溶解抗原垫中的检测抗原,并通过虹吸带动待检抗体、检测抗原及金标抗体mAb1一起向硝酸纤维素膜扩散,并最终渗透到滤纸层中。溶液中的检测抗原在扩散过程中与金标抗体mAb1结合,金标抗体-抗原复合物在检测膜上被检测印迹中的mAb2拦截,形成红色检测线T标记“|”,多余的金标抗体不能与检测印迹结合而继续扩散,在检测膜上被质控印迹中的pAb2或SPA,生成红棕色标记“|”,两种标记组合叠加,形成两条红色阴性标记“||”,且检测线T显色强度与空白对照相当,表示样品中不含有新城疫病毒抗体;当待检样品中含有新城疫病毒抗体时,样品中的新城疫中和抗体先与检测抗原结合,封闭检测抗原与金标抗体mAb1的结合位点,抑制或完全阻断金标抗体-抗原复合物的形成,导致检测膜上的检测印迹mAb2不能有效拦截金标复合

物而使检测线T显色减弱,表示样品中含有新城疫中和抗体,中和抗体水平越高,检测线T越弱直至完全消失,试纸形成检测线T明显弱于空白对照的红色标记“|”为弱阳性,只显示一条质控线C红色标记“|”为强阳性。如果检测膜上没有红棕色标记显示,则表明试纸条已失效。

[0135] (16) 新城疫抗体阻断检测试纸检测实例操作方法

[0136] (16.1) 检测血清样品的制备

[0137] 采集待检血清,取100 μ L血清样品加入300 μ L PBS或生理盐水进行1:2、1:4、1:8……倍比稀释后进行检测。

[0138] (16.2) 试纸检测

[0139] 取1:2稀释的待检血清样品100 μ L,滴入试纸的加样孔(S)中,静置5min~10min观察结果。

[0140] (16.3) 检测结果判定

[0141] 试纸显现两条红色条带(检测线和质控线)“||”,且检测线T显色强度与空白对照相当,为新城疫病毒抗体阴性,表示待检样品中不含有新城疫病毒抗体;显现两条红色条带“|”,但检测线T明显弱于空白对照,为新城疫病毒抗体弱阳性,表示待检样品中含有低水平新城疫中和抗体;只显现一条红色条带(质控线)“|”为新城疫病毒抗体强阳性,表示待检样品中含有高水平新城疫中和抗体;试纸未显现任何条带表明检测操作不当或试纸失效,需另取检测试纸重新检测。

[0142] (17) 新城疫抗体阻断检测试纸性能评价

[0143] (17.1) 敏感性

[0144] 用PBS或生理盐水1:2、1:4、1:8……倍比稀释NDV标准阳性血清(HI效价7log₂),以新城疫抗体阻断检测试纸和血凝抑制(HI)试验进行平行检测,并以TSR3000读条仪测定试纸检测线吸光值(ROD),计算试纸检测NDV抗体的半数抑制效价,并以HI效价为参照评价新城疫抗体阻断检测试纸的敏感性,结果显示NDV阳性血清的HI效价为7log₂,在血清2⁻⁷稀释时试纸检测线T显色明显减弱(弱阳性),半数抑制效价为7log₂,在血清2⁻⁵稀释时试纸检测线T完全阻断(强阳性),完全抑制效价为5log₂,因此试纸对NDV抗体半数抑制(弱阳性)的敏感性与HI相当,完全抑制(强阳性)的敏感性为4HI(2log₂)单位(图8)。

[0145] (17.2) 特异性

[0146] 用PBS或生理盐水1:2稀释NDV、H5和H9亚型禽流感(AIV)、马立克氏病病毒(MDV)、鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV)和鸡传染性支气管炎病毒(IBV)等标准阳性血清,以新城疫抗体阻断检测试纸进行平行检测,同时设置空白对照,发现NDV血清完全阻断检测线T显色,为强阳性,其他相关病毒阳性血清检测线T显色无明显变化,为阴性(图9),表明新城疫抗体阻断检测试纸特异性强,与禽相关疫病抗体无交叉反应。

[0147] 实施例一,家禽新城疫母源抗体水平监测,采集雏禽血清,取100 μ L血清样品加入300 μ L PBS或生理盐水进行稀释,制备待检血清溶液,以新城疫抗体阻断检测试纸按(16)操作方法和结果判定,检测家禽新城疫母源抗体水平。试纸显现两条红色条带(检测线和质控线)“||”,且检测线T显色强度与空白对照相当,为新城疫病毒抗体阴性,表示待检血清样品中不含有新城疫母源抗体;显现两条红色条带“|”,但检测线T明显弱于空白对照,为新城疫病毒抗体弱阳性,表示待检血清样品中含有低水平新城疫母源抗体,血清HI效

价低于 $4\log_2$;只显现一条红色条带(质控线)“|”为新城疫病毒抗体强阳性,表示待检血清样品中含有高水平新城疫母源抗体,血清HI效价高于 $4\log_2$;试纸未显现任何条带表明检测操作不当或试纸失效,需另取检测试纸重新检测。新城疫抗体阻断检测试纸对雏禽血清新城疫中和抗体的检测可实现对家禽母源抗体水平的实时监测,试纸强阳性表示血清中和抗体HI效价高于 $8\log_2$,而弱阳性和阴性表示血清中和抗体低于 $4\log_2$,不能为雏禽提供完全保护,同时对新城疫弱毒疫苗影响较小,为雏禽新城疫弱毒疫苗首免日龄提供技术指导。

[0148] 实施例二,家禽新城疫疫苗免疫效果评价,新城疫弱毒疫苗免疫后7~10天、灭活疫苗免疫后2~3周,采集免疫禽血清,取100 μ L血清样品加入300 μ L PBS或生理盐水进行1:2、1:4、1:8……倍比稀释,制备待检血清溶液,以新城疫抗体阻断检测试纸按(16)操作方法进行检测结果判定,检测家禽新城疫母源抗体水平。试纸显现两条红色条带(检测线和质控线)“||”,且检测线T显色强度与空白对照相当,为新城疫病毒抗体阴性,表示待检血清样品中不含有新城疫中和抗体;显现两条红色条带“||”,但检测线T明显弱于空白对照,为新城疫病毒抗体弱阳性,表示待检血清样品中含有低水平新城疫中和抗体,血清HI效价低于 $4\log_2$;只显现一条红色条带(质控线)“|”为新城疫病毒抗体强阳性,表示待检血清样品中含有高水平新城疫中和抗体,血清HI效价高于 $4\log_2$;试纸未显现任何条带表明检测操作不当或试纸失效,需另取检测试纸重新检测。新城疫抗体阻断检测试纸对免疫家禽血清新城疫中和抗体的检测可实现对新城疫疫苗(弱毒疫苗和灭活疫苗)免疫中和抗体水平的实时监测,试纸强阳性表示血清中和抗体HI效价高于 $4\log_2$,而弱阳性和阴性表示血清中和抗体低于 $4\log_2$,不能为雏禽提供完全保护,实现对免疫家禽新城疫疫苗免疫效果的快速评价,为新城疫疫苗免疫程序制定和调整提供技术指导。

[0149] 实施例三,家禽新城疫病毒抗体水平监测,在家禽新城疫疫苗免疫后的不同时间段,分别采集免疫禽血清,取100 μ L血清样品以PBS或生理盐水进行1:2、1:4、1:8……倍比稀释,制备待检血清溶液,以新城疫抗体阻断检测试纸按(16)操作方法进行检测结果判定,检测家禽新城疫免疫抗体水平动态变化。试纸显现两条红色条带(检测线和质控线)“||”,且检测线T显色强度与空白对照相当,为新城疫病毒抗体阴性,表示待检血清样品中不含有新城疫中和抗体;显现两条红色条带“||”,但检测线T明显弱于空白对照,为新城疫病毒抗体弱阳性,表示待检血清样品中含有低水平新城疫中和抗体,血清HI效价低于 $4\log_2$;只显现一条红色条带(质控线)“|”为新城疫病毒抗体强阳性,表示待检血清样品中含有高水平新城疫中和抗体,血清HI效价高于 $4\log_2$;试纸未显现任何条带表明检测操作不当或试纸失效,需另取检测试纸重新检测。新城疫抗体阻断检测试纸对免疫家禽血清新城疫中和抗体的检测可实现对新城疫疫苗(弱毒疫苗和灭活疫苗)免疫中和抗体水平变化的实时监测,试纸强阳性表示血清中和抗体HI效价高于 $4\log_2$,而弱阳性和阴性表示血清中和抗体低于 $4\log_2$,不能为雏禽提供完全保护,需要及时进行新城疫疫苗免疫,为新城疫疫苗免疫程序制定和调整提供技术指导。

[0150] 实施例四,禽鸟新城疫病毒感染抗体监测,按一定比例采集家禽或野生鸟类血清,取100 μ L血清样品以PBS或生理盐水进行1:2、1:4、1:8……倍比稀释,制备待检血清溶液,以新城疫抗体阻断检测试纸按(16)操作方法进行检测结果判定,检测家禽或野生鸟类新城疫抗体及其抗体效价。试纸显现两条红色条带(检测线和质控线)“||”,且检测线T显色强度与空白对照相当,为新城疫病毒抗体阴性,表示待检血清样品中不含有新城疫病毒抗体;显

现两条红色条带“||”，但检测线T明显弱于空白对照，为新城疫病毒抗体弱阳性，表示待检血清样品中含有低水平新城疫病毒抗体，血清HI效价低于 $4\log_2$ ；只显现一条红色条带（质控线）“|”为新城疫病毒抗体强阳性，表示待检血清样品中含有高水平新城疫病毒抗体，血清HI效价高于 $4\log_2$ ；试纸未显现任何条带表明检测操作不当或试纸失效，需另取检测试纸重新检测。利用新城疫抗体阻断检测试纸检测家禽血清抗体时，如抗体效价显著升高（ $11\sim 14\log_2$ ），且抗体水平参差不齐，离散度较大，则表明家禽存在新城疫病毒感染，可结合流行病学、临床症状和病理变化做出诊断，为家禽新城疫疫病诊断提供参考。利用新城疫抗体阻断检测试纸检测野生鸟类血清抗体时，由于野生鸟类未进行疫苗免疫，血清抗体阳性（弱阳性和强阳性）表示野生鸟类存在新城疫病毒感染或曾感染新城疫病毒，为野生鸟类新城疫病毒流行病学调查和监测提供技术支撑。

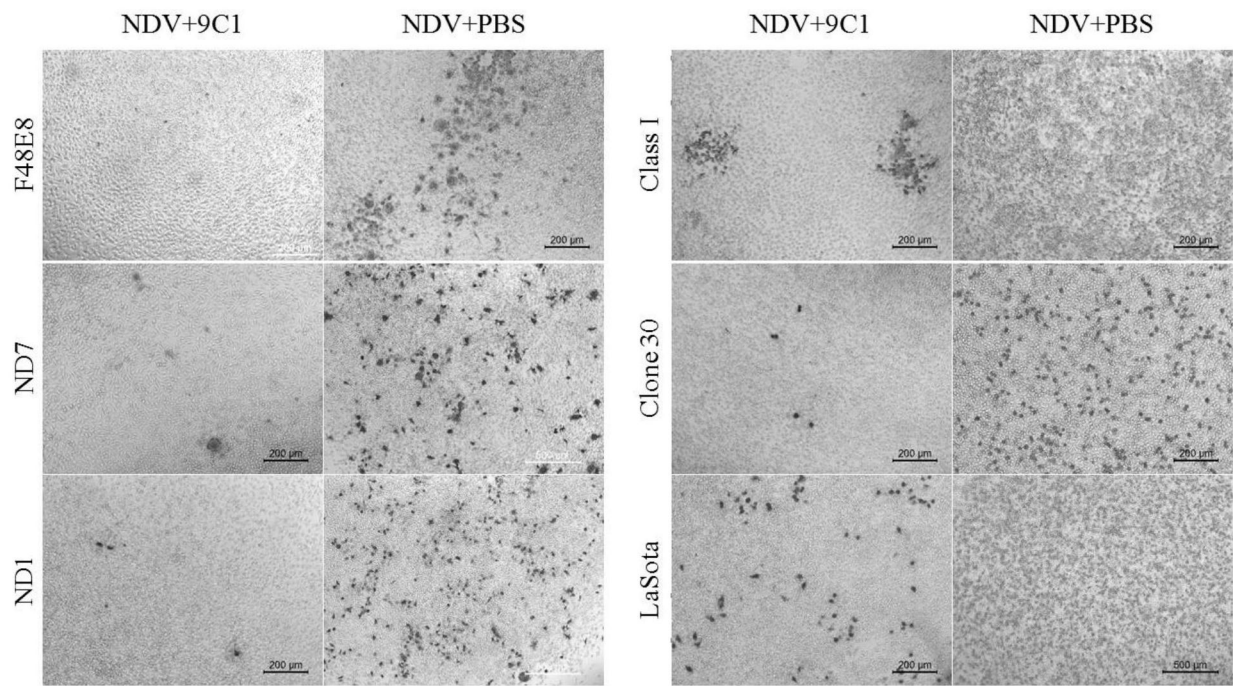


图1

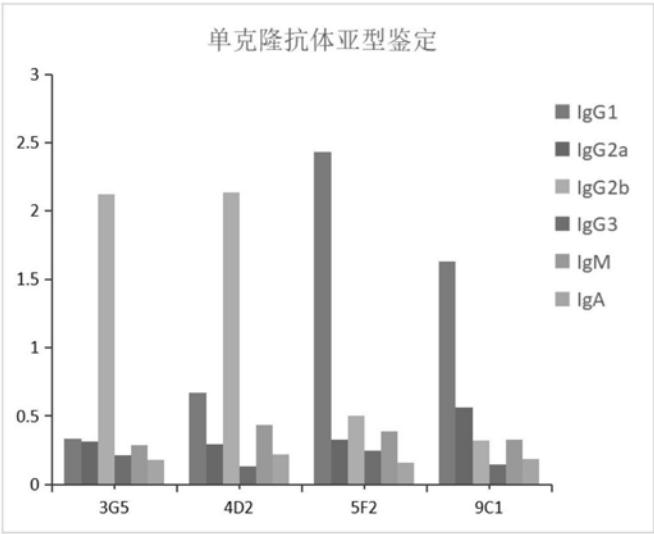


图2

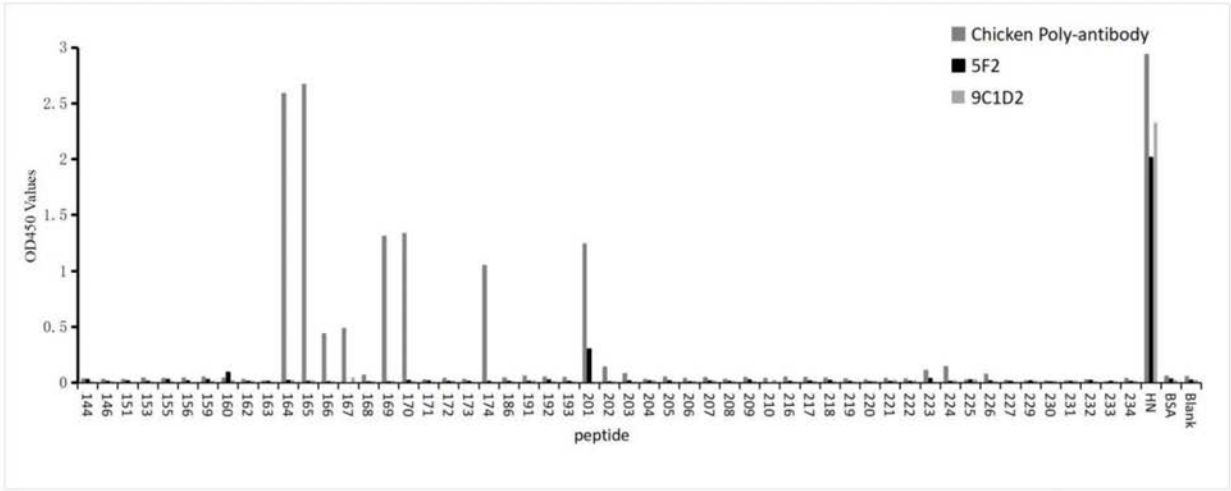


图3



图4

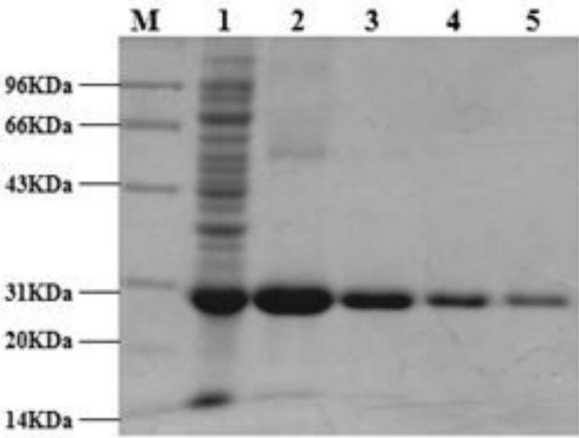


图5

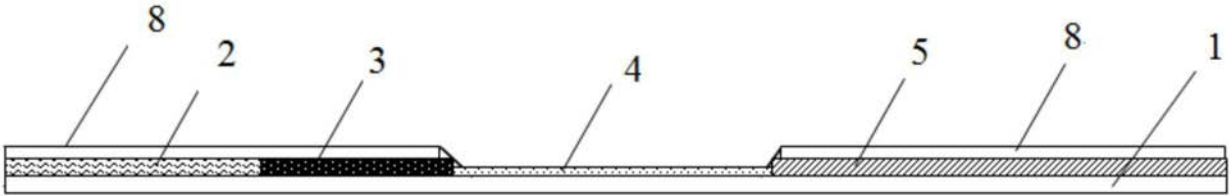


图6

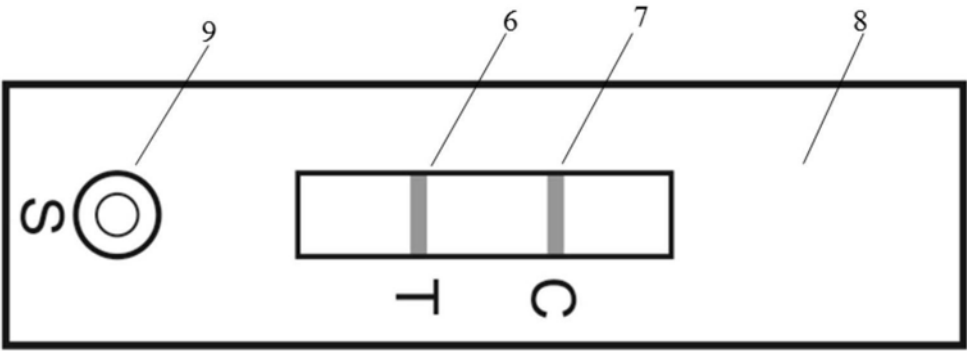


图7

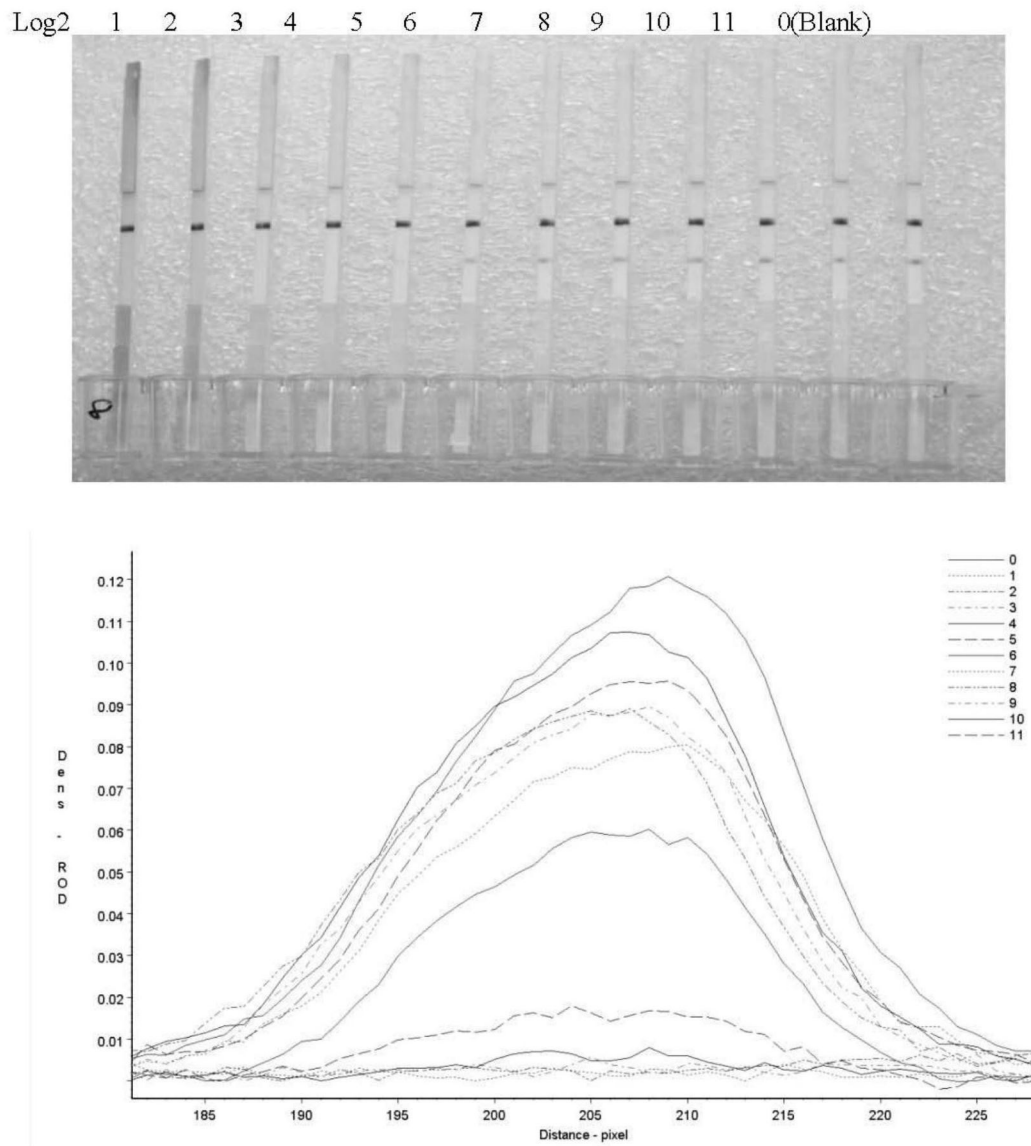


图8

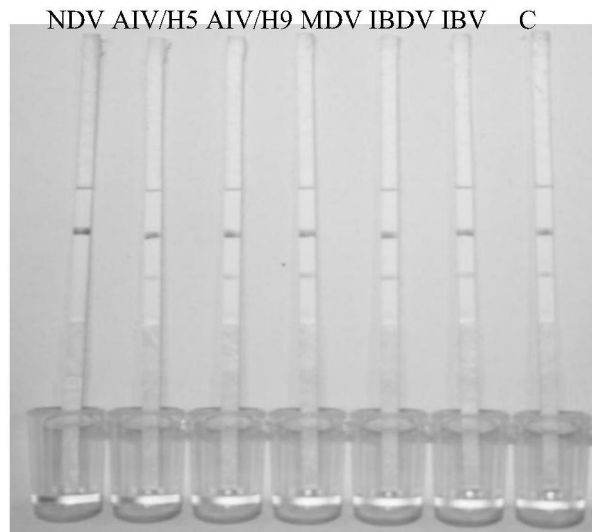


图9

专利名称(译)	一种新城疫抗体阻断检测试纸		
公开(公告)号	CN110018304A	公开(公告)日	2019-07-16
申请号	CN201910403535.6	申请日	2019-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
[标]发明人	张改平 李青梅 郭军庆 王丽 孙亚宁 刘金玲 杨继飞 柴书军 邢广旭 张二芹 罗俊		
发明人	张改平 李青梅 郭军庆 王丽 孙亚宁 刘金玲 马凡舒 杨继飞 柴书军 邢广旭 张二芹 罗俊		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/56983		
代理人(译)	张爱军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种新城疫抗体阻断检测试纸，由支撑板、抗原垫、金标垫、检测膜和吸水垫构成，抗原垫吸附新城疫病毒检测抗原，金标垫吸附胶体金标记的抗新城疫病毒单克隆抗体mAb1，检测膜上含有检测线T“|”和质控线C“|”印迹，检测线T为抗新城疫病毒单克隆抗体mAb2或抗新城疫病毒多克隆抗体pAb1印迹“|”，质控线C为免抗小鼠IgG抗体pAb2或金黄色葡萄球菌SPA印迹“|”。本发明试纸实现了新城疫病毒中和抗体的快速检测，可实现对新城疫母源抗体和免疫抗体水平的实时监测，以及疫苗免疫效果的免疫评价，并且操作简单，人人都可操作，能较好满足不同层次人员的需要，易于大范围推广应用，具有广阔的市场前景和较大的经济、社会效益。

序号	mAbs	NDV 毒株								BHK-21
		G1	ND1	ND6	ND7	XX-08	I 系	LaSota	F48E8	
1	1F1	+	-	+	+	+	+	+	+	-
2	1G6	++	++	++	++	++	++	++	+	-
3	1G7	++	++	++	++	++	++	++	±	-
4	2D3	+	+	++	++	+	++	++	++	-
5	3C2	++	+	+	++	+	+	-	±	-
6	3D8	++	++	++	++	++	++	++	±	-
7	3C10	+	+	+	+	+	+	-	+	-
8	3D10	+	+	+	+	+	++	++	++	-
9	4D2	++	++	++	++	++	++	++	++	-
10	5D6	++	+	+	++	+	++	++	++	-
11	5D7	++	+	+	+	+	++	++	±	-
12	5F2	++	-	++	++	++	++	++	++	-
13	8D5	+	+	+	++	+	±	±	±	-
14	8F4	++	++	++	++	++	++	++	±	-
15	9B10	++	++	++	++	++	++	++	+	-
16	9C1	++	+	++	++	+	+	+	±	-
17	11A3	++	+	+	+	+	+	+	+	-
18	11B7	++	++	++	++	++	++	++	+	-
19	11D1	++	++	++	+	++	++	++	±	-
20	12C9	++	+	+	+	++	++	++	+	-
21	13A5	++	++	+	++	++	++	++	+	-
22	13A6	++	++	+	++	++	++	++	+	-
23	13G8	++	++	+	++	++	++	+	+	-
24	16G2	++	++	+	++	++	++	++	+	-