

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610045594.3

[43] 公开日 2007年7月25日

[11] 公开号 CN 101003572A

[22] 申请日 2006.7.19

[21] 申请号 200610045594.3

[71] 申请人 中国海洋大学

地址 266003 山东省青岛市市南区鱼山路5号

[72] 发明人 战文斌 林颖博 李 强

[74] 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有限公司

代理人 韩振东

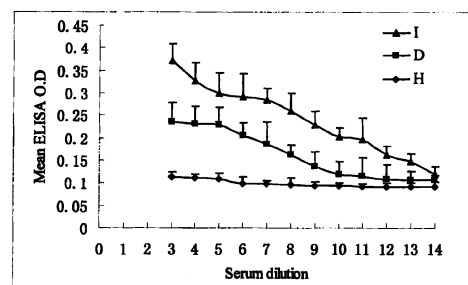
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

[54] 发明名称

牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体及其制备方法

[57] 摘要

本发明是牙鲆抗淋巴囊肿病毒(LCDV)免疫球蛋白的单克隆抗体。其是由名称为杂交瘤细胞 JF-IgM-H, 保藏号为 CCTCC-C200631 的杂交瘤细胞分泌的。该单抗的制备方法如下: 通过福尔马林灭活的 LCDV 免疫牙鲆制备抗血清, 然后提纯该牙鲆免疫球蛋白作为抗原免疫 Balb/c 小白鼠, 应用细胞工程的方法产生融合的杂交瘤细胞, 经过免疫学检测方法筛选出该单抗。间接酶联免疫法和间接免疫荧光抗体法综合确定: 本发明单抗与牙鲆抗 LCDV 免疫球蛋白特异性结合反应真实存在; 转印免疫印迹法确定: 本发明单抗的抗原决定簇位于分子量范围为 70-80kDa 的牙鲆抗 LCDV 免疫球蛋白的重链上。本发明将作为制备早期检测判断牙鲆感染 LCDV 及评价 LCDV 福尔马林灭活疫苗在牙鲆上免疫效果的试剂中的应用。



1、一种牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体，其特征在于：所述的单克隆抗体是由名称为：杂交瘤细胞 JF-IgM-H, 保藏号为：CCTCC-C200631, 保藏日期为：2006 年 07 月 06 日的杂交瘤细胞分泌的。

2、根据权利要求 1 所述牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体，其特征在于：与所述的单克隆抗体发生特异性结合的抗原决定簇位于分子量范围为 70-80kDa 的牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的重链上。

3、一种如权利要求 1 所述牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体的制备方法，其特征在于：所述的方法，其步骤如下：首先，通过福尔马林灭活的牙鲈淋巴囊肿病毒免疫牙鲈制备该牙鲈抗血清；其次，提纯该牙鲈免疫球蛋白，用该牙鲈免疫球蛋白作为抗原，免疫 Balb/c 小白鼠，应用细胞工程的方法产生融合的杂交瘤细胞；再次，经过免疫学检测筛选方法，筛选出分泌牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体的杂交瘤细胞 JF-IgM-H, 该杂交瘤细胞的保藏号为：CCTCC-C200631, 保藏日期为：2006 年 07 月 06 日。

4、根据权利要求 3 所述牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体的制备方法，其特征在于：所述的免疫学检测筛选方法是：间接酶联免疫法，间接免疫荧光抗体法和转印免疫印迹法。其中间接酶联免疫法和间接免疫荧光抗体法综合证实：本发明单抗与牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白特异性结合反应真实存在；转印免疫印迹法证实：本发明单抗的抗原决定簇位于分子量范围为 70-80kDa 的牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的重链上。

5、一种如权利要求 1 所述牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体在作为制备早期检测判断牙鲈感染淋巴囊肿病毒试剂中的应用。

6、一种如权利要求 1 所述牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体在作为制备评价淋巴囊肿病毒福尔马林灭活疫苗在牙鲈上免疫效果的试剂中的应用。

牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体及其制备方法

技术领域

本发明涉及免疫学应用技术的改进，具体讲是一种牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 抗淋巴囊肿病毒 (LCDV) 免疫球蛋白的单克隆抗体及其制备方法，其属于鱼类分子免疫学技术领域。

背景技术

近年来，牙鲆已成为我国乃至亚洲的重要海水养殖经济鱼类，在整个海水养殖业中的地位日益显著。但随着养殖规模的扩大，病害问题日益突出，严重影响了该产业的持续健康发展，其中淋巴囊肿病就是危害最为严重的疾病之一。淋巴囊肿病的病原是淋巴囊肿病毒，其是一类寄生于宿主细胞内的非细胞型超微微生物群体，所以至今也未研究出既能杀伤病毒又不损伤宿主细胞的有效药物。另外，该病毒的隐性感染和鱼类特殊的水生环境，使病毒的感染难以觉察，常常一旦发现症状，即到了无法挽救的地步。因此，早期诊断和疫苗的使用将会是防治该病行之有效的方法。

研究证明，鱼类一旦感染某种病原或接种该病原疫苗后，体内都会产生一定量的针对该病原的特异性抗体。因此，通过检测鱼体内针对某病原特异性抗体的产生，从而达到早期诊断和评价疫苗效果的目的。利用牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体检测牙鲆体内特异性抗体的产生，为牙鲆淋巴囊肿病的早期诊断和淋巴囊肿病毒疫苗的使用评价，进而预防及治疗该病毒病有着极为重要理论和现实意义。

发明内容

本发明的目的是填补有关牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体研究的空白，提供一种牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体及其制备方法。本发明拟设计确定牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体的检测方法，筛选出牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体 (简称：单抗)。该单抗将应用到牙鲆淋巴囊肿病的早期诊断和淋巴囊肿病毒疫苗的使用评价中，从而达到预防和治疗该病毒病的目的，实现牙鲆的健康养殖。

本发明的任务是由以下技术方案实现的，研制了一种牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体。所述的单克隆抗体是由名称为：杂交瘤细胞 JF-IgM-H, 保藏号为：CCTCC-C200631, 保藏日期为：2006年07月06日的杂交瘤细胞分泌的。

与所述的单克隆抗体发生特异性结合的抗原决定簇位于分子量范围为 70-80kDa 的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的重链上。

一种所述牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体的制备方法。所述的方法的步骤如下：首先，通过福尔马林灭活的牙鲆淋巴囊肿病毒免疫牙鲆制备该牙鲆抗血清；其次，提纯该牙鲆免疫球蛋白，用该牙鲆免疫球蛋白作为抗原，免疫 Balb/c 小白鼠，应用细胞工程的方法产生融合的杂交瘤细胞；再次，经过免疫学检测筛选方法，筛选出分泌牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体的杂交瘤细胞 JF-IgM-H, 该杂交瘤细胞的保藏号为：CCTCC-C200631, 保藏日期为：2006年07月06日。

所述的免疫学检测筛选方法是：间接酶联免疫法，间接免疫荧光抗体法和转印免疫印迹法。其中所述的间接酶联免疫法和间接免疫荧光抗体法综合确定：该单抗与牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白特异性结合反应真实存在；所述的转印免疫印迹法确定：该单抗的抗原决定簇位于分子量范围为 70-80kDa 的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的重链上。

一种所述牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体在作为制备早期检测判断牙鲆感染淋巴囊肿病毒试剂中的应用。

一种所述牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体在作为制备评价淋巴囊肿病毒福

尔马林灭活疫苗在牙鲆上免疫效果的试剂中的应用。

本发明的单抗经间接酶联免疫反应实验结果显示单抗能与牙鲆血清中的抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白发生特异性结合；间接免疫荧光检测结果显示：牙鲆外周血白细胞表面有黄绿色荧光，即表征本发明的单抗能与白细胞表面的抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白发生特异性反应。

本发明的单抗经转印免疫印迹检测结果显示：变性后的免疫球蛋白的重链结合有该单抗，即表征本发明的单抗的抗原决定簇位于分子量范围为 70-80kDa 的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的重链上。

在倒置显微镜下观察，生长状态良好的该杂交瘤细胞分裂旺盛、外观饱满、浑圆、折光性强、细胞大小均一、贴壁良好；该杂交瘤细胞有无限分裂增生能力；长势良好的该杂交瘤细胞常规培养 2-3 天，其培养基由桃红色转变为黄色，该培养基中含有该杂交瘤细胞分泌的大量的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体。

本发明的优点在于：由于本发明制备了牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体，为牙鲆淋巴囊肿病的早期诊断和淋巴囊肿病毒疫苗的使用评价，进而预防及治疗该病毒病有着极为重要的理论和现实意义。由于本发明重要的制备技术路线是：通过福尔马林灭活的牙鲆淋巴囊肿病毒免疫牙鲆制备抗血清，提纯牙鲆免疫球蛋白，用其作为抗原免疫 Balb/c 小白鼠，应用免疫学方法，制备出牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体，再经过免疫学检测筛选方法筛选出牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单抗。这样的制备技术路线设计新颖，严密而合理。本发明的创新点在于：本发明通过用福尔马林灭活的淋巴囊肿病毒免疫牙鲆使其大量产生免疫球蛋白，然后提纯血清中的免疫球蛋白作为抗原，通过免疫学方法制备出牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单抗。由于使用的间接酶联免疫技术，通过包被淋巴囊肿病毒于酶标板上，吸附牙鲆血清中针对淋巴囊肿病毒的特异性免疫球蛋白，使该特异性免疫球蛋白达到了最大程度的纯化，使得确认该发明单抗与牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白发生的特异性结合反应真实存在。本发明将免疫荧光抗体法和转印免疫印迹法结合起来，能够更加直观的显示该发明单抗与非变性的和变性后的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白发生特异性结合反应。在外周血白细胞表面有点状黄绿色荧光，证实该单抗能与白细胞表面的抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白发生特异性结合反应；通过转印免疫印迹结果显示在变性后的免疫球蛋白重链处显示紫褐色条带，即进一步证实与该发明单抗发生特异性结合反应的抗原决定簇位于分子量范围为 70-80kDa 的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的重链上。

附图说明

图 1 为本发明的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单抗制备方法的工艺流程方框图。

图 2-A 为本发明的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单抗的间接免疫荧光结果图。

图 2-B 为与本发明的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单抗的间接免疫荧光结果图对应的微分干涉图。

图 3 为本发明的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单抗的转印免疫印迹结果图。

图 4 为间接酶联免疫法检测健康牙鲆、患淋巴囊肿病毒病牙鲆和经淋巴囊肿病毒福尔马林灭活疫苗免疫的牙鲆血清内特异性抗体水平结果图。

参见图 1—图 4：

图 1 表示本发明的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体的制备方法的工艺流程是：以福尔马林灭活的牙鲆淋巴囊肿病毒免疫牙鲆制备抗血清，提纯其中的免疫球蛋白，以此为抗原，应用免疫学方法，获得杂交瘤细胞 JF-IgM-H，该杂交瘤细胞的保藏号为：CCTCC-C200631，保藏日期为：2006 年 07 月 06 日，该杂交瘤细胞分泌出牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体。

图 2-A 是牙鲆外周血白细胞与本发明的单抗反应，部分白细胞的细胞膜上呈现点状黄绿色荧光；图 2-B 是同一视野的微分干涉照片；图中标尺为 20 μ m。

图 3 中有：1 是标准分子量蛋白的考马斯亮蓝染色结果；2 表示提纯的牙鲆抗淋巴囊肿

病毒免疫球蛋白考马斯亮蓝染色结果；3 表示本发明的单抗与变性后的牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白反应，识别的蛋白为牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的重链，分子量范围为 70-80kDa。

图 4 表示通过本发明的牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单抗，利用间接酶联免疫技术检测健康牙鲈、患淋巴囊肿病毒病牙鲈和经淋巴囊肿病毒福尔马林灭活疫苗免疫的牙鲈血清内针对淋巴囊肿病毒的特异性抗体水平。I 表示经淋巴囊肿病毒福尔马林灭活疫苗免疫的牙鲈；D 表示患淋巴囊肿病毒病牙鲈；H 表示健康牙鲈。

具体实施方式

本发明的牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体的制备方法结合实施例及其附图进一步说明如下：

实施例 1：

研制牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体

一、抗原的制备

(1) 牙鲈淋巴囊肿病毒的制备

①取患病牙鲈，先用 70%酒精棉球消毒患部，再用灭菌手术刀片切下囊肿，加入适量石英砂和 TNE (50 mM Tris, 00 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) 缓冲液，匀浆；

②匀浆液离心 (4℃, 500g, 20min)，取上清；

③上清液离心 (4℃, 1800g, 20min)，取上清；

④上清液和蔗糖配成 30% (W/W) 的蔗糖溶液，4℃, 78500g 离心 120min，弃上清；

⑤向沉淀添加 TNE 至 1ml，混匀，轻置于蔗糖梯度液 (37%、40%、47%、52%、57%、62%) 上方，4℃, 78500g 离心 120min；

⑥吸出蔗糖梯度中的病毒带，调整蛋白含量为 1mg/ml，-80℃保存备用。

(2) 牙鲈抗血清的制备

免疫用牙鲈为健康牙鲈，平均体重为 250g，用提纯的牙鲈淋巴囊肿病毒经 0.2%福尔马林灭活后作为抗原，每次的免疫剂量为 0.5ml。免疫共分 4 次进行，前 2 次免疫间隔为 2 周，后 3 次免疫间隔为 1 周，均为腹腔注射。

①基础免疫：提纯的病毒与福氏完全佐剂等量 (V/V) 混匀作为抗原；

②加强免疫：提纯的病毒与福氏不完全佐剂等量 (V/V) 混匀作为抗原；

③二次加强免疫：提纯的病毒作为抗原；

④三次加强免疫：提纯的病毒作为抗原；

最后一次免疫后第七天，尾静脉取血，37℃静置 1h，4℃过夜，次日离心 (4℃, 3000rpm, 20min)，取上清，-80℃分装保存。

(3) 牙鲈免疫球蛋白的纯化

①盐析：血清中缓慢加入等量的饱和硫酸铵，4℃搅拌 2h 后静置过夜，次日离心 (4℃, 14000rpm, 30min)，弃上清，沉淀用 0.02M Tris-HCL 缓冲液 (pH 8.0) 重悬。

②透析：沉淀重悬液 4℃透析 24h，每 4h 换液一次，透析外液为 0.02M Tris-HCL 缓冲液 (pH 8.0)。

③层析：透析后液体离心 (4℃, 14000rpm, 30min)，取上清，过 DEAE 离子交换柱层析，0.02M Tris-HCL 缓冲液 (pH 8.0) 洗涤未结合蛋白；然后依次用 0.05、0.1、0.15、0.2、0.4、1M NaCl (0.02M Tris-HCL 缓冲液配制，pH 8.0) 洗脱结合蛋白，收集 0.1M NaCl 的洗脱峰，冻干浓缩，PBS 重悬，调整蛋白含量为 1mg/ml，-80℃保存备用。

二、免疫小鼠

用提纯的牙鲈免疫球蛋白作为抗原。每次的免疫剂量为 0.1ml，免疫共分 4 次进行，前 2 次免疫间隔为 2 周，后 3 次免疫间隔为 1 周，前两次为腹腔注射，后两次为尾静脉注射：

(1) 基础免疫：提纯的牙鲈免疫球蛋白与福氏完全佐剂等量 (V/V) 混匀作为抗原；

- (2) 加强免疫：提纯的牙鲆免疫球蛋白与福氏不完全佐剂等量 (V/V) 混匀作为抗原；
- (3) 二次加强免疫：提纯的牙鲆免疫球蛋白作为抗原；
- (4) 融合前三天的扩增免疫：提纯的牙鲆免疫球蛋白作为抗原。

三、细胞融合

(1) 脱颈椎处死免疫小鼠，无菌取出脾脏和胸腺后，分别过 100 目网筛，用 RPMI-1640 溶液吹打形成单细胞悬液；

(2) 分别将脾细胞悬液和胸腺细胞悬液 1000rpm 离心 3min，弃去上清液，脾细胞沉淀用 RPMI-1640 溶液重悬，胸腺细胞沉淀用含有 1%HAT 的 RPMI-1640 (含 10%胎牛血清) 选择性细胞培养液重悬。

(3) 取 3×10^7 个处于对数生长期的 P3-X63-Ag8U1 骨髓瘤细胞，1000rpm 离心 3min，去上清液后，用 RPMI-1640 溶液重悬；

(4) 将脾细胞悬液与瘤细胞悬液混合均匀后，1000rpm 离心 3min，完全吸去上清液，轻弹离心管底，使两种细胞沉淀充分混匀成糊状；用吸管吸取预温到 37℃ 的聚乙二醇溶液 1ml，滴加到离心管内，在 1min 内加完；然后在 37℃ 水浴静置 5min；

(5) 继续滴加已经预温到 37℃ 的 RPMI-1640 溶液 15ml，使 PEG 稀释而失去作用；

(6) 补加 RPMI-1640 溶液至 40ml，经 1000rpm 离心 3min，弃去上清液；

(7) 将沉淀的细胞用 3ml 37℃ 的 RPMI-1640 (含 10%胎牛血清) 细胞培养液重悬，冻存 2ml；

(8) 将剩下的 1ml 细胞悬液加入 (2) 制成的胸腺细胞悬液，混合均匀后滴加到 96 孔培养板中；

(9) 将培养板放入 37℃，CO₂ 浓度为 4.5% 的培养箱中培养，倒置显微镜观察细胞生长情况，大约两周后，取杂交瘤细胞培养上清液检测。

四、筛选和克隆

(1) 筛选：融合后，待杂交瘤细胞群长到 96 孔培养板的孔底面积 1/3 时开始检测，采用间接酶联免疫技术筛选阳性杂交瘤细胞。

① 包被抗原：将牙鲆淋巴囊肿病毒用碳酸盐包被液 (pH 9.6) 1:10 稀释，加入 96 孔酶标板中 (50μl/孔)，4℃ 包被过夜；

② 吸出包被液，用含 0.05% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗涤，每次 5min，洗三次；

③ 每孔加入 200μl 3% 的牛血清白蛋白 (PBS 配)，37℃ 封闭 1h；

④ 同②法洗涤三次；

⑤ 每孔加入牙鲆抗血清 (1:10 稀释) 50μl，37℃ 温箱孵育 2h；

⑥ 同②法洗涤三次；

⑦ 将杂交瘤细胞培养上清作为第一抗体按每孔 50μl 加入至酶标板，37℃ 温箱孵育 1h；

⑧ 同②法洗涤三次；

⑨ 碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠 Ig (1:4000 稀释) 作为第二抗体按每孔 50μl 加入至酶标板，37℃ 温箱孵育 1h；

⑩ 同②法洗涤三次；然后每孔加入 100μl 4-硝基酚磷酸盐 (pNPP) 应用液，暗处反应 5—20min，每孔加入 50μl 2M 的 NaOH，稳定 3—5min 即可用 405nm 工作波长测定 OD 值。测波长为 405nm 时各孔光吸收值，计算各实验孔与阴性对照光吸收值之比 (P/N)，当 P/N ≥ 2.1 时该孔为阳性。

(2) 克隆：采用有限稀释法对检测出的阳性杂交瘤细胞进行克隆，步骤如下：

① 脱颈椎处死小鼠，无菌取出胸腺，在 100 目网筛上研磨，用 RPMI-1640 溶液吹打形成单细胞悬液；

② 把胸腺细胞悬液 1000rpm 离心 3min，弃去上清液，胸腺细胞沉淀用 10ml RPMI-1640 (含 10%胎牛血清) 细胞培养液重悬；

③把要克隆的阳性细胞孔中的细胞用血球记数板记数，然后用培养液以10倍梯度稀释，取出100个杂交瘤细胞，放入胸腺细胞悬液中；

④细胞悬液用滴管吹打均匀，滴加到96孔培养板中，每孔100 μ l，平均每个孔含有一个杂交瘤细胞；

⑤放入CO₂培养箱中培养；

⑥两周后通过间接酶联免疫技术检测各孔杂交瘤细胞培养上清，把所得阳性克隆孔的杂交瘤细胞按上述方法再克隆一次，以保证形成单克隆。

五、冻存

取生长旺盛，形态良好的杂交瘤细胞，制成细胞悬液，200g离心5min，去上清，加冻存液（9份RPMI-1640培养基+1份二甲亚砷），使最终细胞密度为5 \times 10⁶个/ml，将1ml细胞悬液装于2ml冻存管中，拧紧螺盖，然后将冻存管装入盛有棉花的小盒内，放于-80℃超低温冰箱内过夜（8-12小时）后，再浸入液氮内长期保存。本发明获得的生长旺盛，形态良好的杂交瘤细胞，其名称为：杂交瘤细胞JF-IgM-H，保藏号为：CCTCC-C200631，保藏日期为：2006年07月06日。

实施例2：

本发明单抗的间接酶联免疫法鉴定：

(1)包被抗原：将淋巴囊肿病毒用碳酸盐包被液（pH 9.6）1:10稀释，加入96孔酶标板中（50 μ l/孔），4℃包被过夜；

(2)吸出包被液，用PBST洗涤，每次5min，洗三次；

(3)每孔加入200 μ l 3%的牛血清白蛋白（PBS配）37℃封闭1h；

(4)同②法洗涤三次；

(5)每孔加入牙鲈抗血清（1:10稀释）50 μ l，37℃温箱孵育2h；

(6)同②法洗涤三次；

(7)将上述筛选和克隆出的杂交瘤细胞培养上清作为第一抗体按每孔50 μ l加入至酶标板，37℃温箱孵育1h；

(8)同②法洗涤三次；

(9)碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠Ig（1:4000稀释）作为第二抗体按每孔50 μ l加入至酶标板，37℃温箱孵育1h；

(10)同②法洗涤三次；然后每孔加入100 μ l pNPP应用液，暗处反应5-20min，每孔加入50 μ l 2M的NaOH，稳定3-5min即可用405nm工作波长测定OD值。

用健康牙鲈血清作为阴性对照，测波长为405nm时各孔光吸收值，计算阳性血清与阴性血清光吸收值之比（P/N），当P/N \geq 2.1时为阳性。

结果：阳性：0.412；阴性对照：0.102。此结果证实本发明单抗能与牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白发生特异性结合反应。

实施例3：

本发明单抗的转印免疫印迹法鉴定：

(1)十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳：

①将提取的牙鲈免疫球蛋白加入等比例含十二烷基磺酸钠的样品缓冲液，在沸水中煮3-5min；

②将①处理过的样品加入上样孔中，每孔内加样品10 μ l，在恒流条件下，起始时用低电流（30-40mA），待样品在浓缩胶部分浓缩成一条线后，加大电流（50-70mA），电泳至溴酚蓝指示剂达到底部边缘时即可停止电泳，取出凝胶；

③剪取一块与电泳凝胶相同大小的硝酸纤维素膜（孔径0.22 μ m）以电转移缓冲液（电转移缓冲液：25mmol/L Tris-Base，192mmol/L 甘氨酸，20%甲醇，pH 8.3）润湿，放在电泳后的凝胶上。在硝酸纤维素膜上剪掉一个角，以标志样品顺序的起始端。用润湿的滤纸支持，将第

二块润湿的滤纸贴在凝胶片的另一面；按上述放置顺序，使胶块与硝酸纤维素膜及滤纸形成一套夹心的“三明治”；

④将“凝胶三明治”置入盛有电转移缓冲液的电泳槽内，将硝酸纤维素膜面向阳极；电泳恒流 200mA，通电 5 小时；

⑤转移完毕，取出硝酸纤维素膜。

(2) 免疫印迹：

①将硝酸纤维素膜用 PBS 洗 10 分钟，然后置 3%的牛血清白蛋白溶液（PBS 配）中封闭 1h，37℃；

②用 PBST 洗 3 次，每次 5 分钟；

③将硝酸纤维素膜置于杂交瘤细胞培养上清中，37℃缓慢摇动 1 小时；

④同②法洗涤三次；

⑤将硝酸纤维素膜加入碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠 Ig 抗体(1:4000 稀释)中，37℃缓慢摇动 1 小时；

⑥同②法洗涤三次；

⑦把硝酸纤维素膜放入碱性磷酸酶发色液（NBT-BCIP 发色液）中发色，直到颜色清晰为止；

⑧用去离子水洗涤，以终止反应。将硝酸纤维素膜夹在滤纸间，干燥。置暗处保存。

结果：本发明单抗与分子量范围为 70-80kDa 的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的重链发生特异性反应，显示紫褐色条带，而阴性对照无条带显示。

实施例 4：

本发明单抗的间接免疫荧光抗体法鉴定：

(1) 牙鲆外周血白细胞的采集：

注射器中预先放置适量的单细胞悬浮介质 eRPMI（65% RPMI-1640 双蒸水稀释，含 20IU ml⁻¹ heparin, 0.1% (w/v) NaN₃ 和 1% (w/v)的牛血清白蛋白，pH 7.4, 240 mOsm kg⁻¹），同血清采集法采集用福尔马林灭活的淋巴囊肿病毒免疫的牙鲆血液，采集的血液 4℃放置 1h，然后 4℃下 100g 离心 10 min，去沉淀，上清用 Percoll 不连续梯度（1.070 和 1.020 g cm⁻³）离心，收集界面细胞，PBS 洗涤备用。

(2) 间接免疫荧光：

① 粗提的白细胞约 1×10⁷ 个用 500μl 杂交瘤培养上清重悬，4℃孵育 1h；

② PBS 680g，4℃离心洗涤 3 次，每次 5min；

③ 加入异硫氰酸荧光素标记的羊抗小鼠 Ig（1:500 稀释），4℃孵育 1h；

④ PBS 680g，4℃离心洗涤 3 次，每次 5min；

⑤ PBS 重悬，滴片，荧光显微镜观察拍照。

结果：提取的外周血白细胞的部分白细胞膜上呈现点状黄绿色荧光，表明本发明单抗可以与外周血白细胞表面分泌的抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白发生特异性结合反应。

实施例 5：

采用本发明研制出的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体，在作为制备早期检测判断牙鲆是否感染淋巴囊肿病毒试剂中的应用。

采用本发明研制出的牙鲆抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体，在作为制备评价淋巴囊肿病毒福尔马林灭活疫苗免疫效果的试剂中的应用。

(1) 样品的制备：

① 淋巴囊肿病毒灭活疫苗的制备：

按照实施例 1 中的方法，提纯淋巴囊肿病毒，然后经 0.2%的福尔马林，4℃灭活 24h；离心去除福尔马林（4℃，78500g，120min），TNE 缓冲液重悬，备用。

② 牙鲆的免疫：

采用上述制备的淋巴囊肿病毒灭活疫苗，按照实施例 1 中的方法免疫牙鲆。

③ 牙鲆血清的采集；

按照实施例 1 中血清的采集方法，采集三种牙鲆的血清，即：采集健康牙鲆、患淋巴囊肿病毒病牙鲆和经淋巴囊肿病毒灭活疫苗免疫的牙鲆的血清。

(2) 间接酶联免疫技术检测：

①包被抗原：将淋巴囊肿病毒用碳酸盐包被液（pH 9.6）1:10 稀释，加入 96 孔酶标板中（50 μ l/孔），4 $^{\circ}$ C 包被过夜；

② 吸出包被液，用 PBST 洗涤，每次 5min，洗三次；

③ 每孔加入 200 μ l 3%的牛血清白蛋白（PBS 配）37 $^{\circ}$ C 封闭 1h；

④ 同②法洗涤三次；

⑤ 每孔加入牙鲆血清（2 倍比稀释）50 μ l，37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 2h；

⑥ 同②法洗涤三次；

⑦ 将杂交瘤细胞培养上清作为第一抗体按每孔 50 μ l 加入至酶标板，37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 1h；

⑧ 同②法洗涤三次；

⑨ 碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠 Ig（1:4000 稀释）作为第二抗体按每孔 50 μ l 加入至酶标板，37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 1h；

⑩同②法洗涤三次；然后每孔加入 100 μ l pNPP 应用液，暗处反应 5—20min，每孔加入 50 μ l 2M 的 NaOH，稳定 3—5min 即可用 405nm 工作波长测定 OD 值。

结果：检测各组牙鲆血清从 2^3 — 2^{14} 按照 2 倍比稀释后血清中特异性抗体水平，结果发现免疫组，患病组牙鲆抗体水平均高于健康组。表明牙鲆感染淋巴囊肿病毒后，体内会产生针对淋巴囊肿病毒的特异性抗体。鉴于淋巴囊肿病毒隐性感染的特点，可以通过检测特异性抗体的产生，判断牙鲆是否感染淋巴囊肿病毒，进而使得本发明单抗可以用作制备早期判断牙鲆是否感染淋巴囊肿病毒的试剂。

经淋巴囊肿病毒福尔马林灭活疫苗免疫后的牙鲆，其血清内特异性抗体水平明显升高，表明该疫苗已经起到了一定的免疫效果，从而证实本发明单抗可以用作制备评价淋巴囊肿病毒福尔马林灭活疫苗在牙鲆上的免疫效果的试剂工具。

本领域的普通技术人员都会理解，在本发明的保护范围内，对于上述实施例进行修改，添加和替换都是可能的，其都没有超出本发明的保护范围。

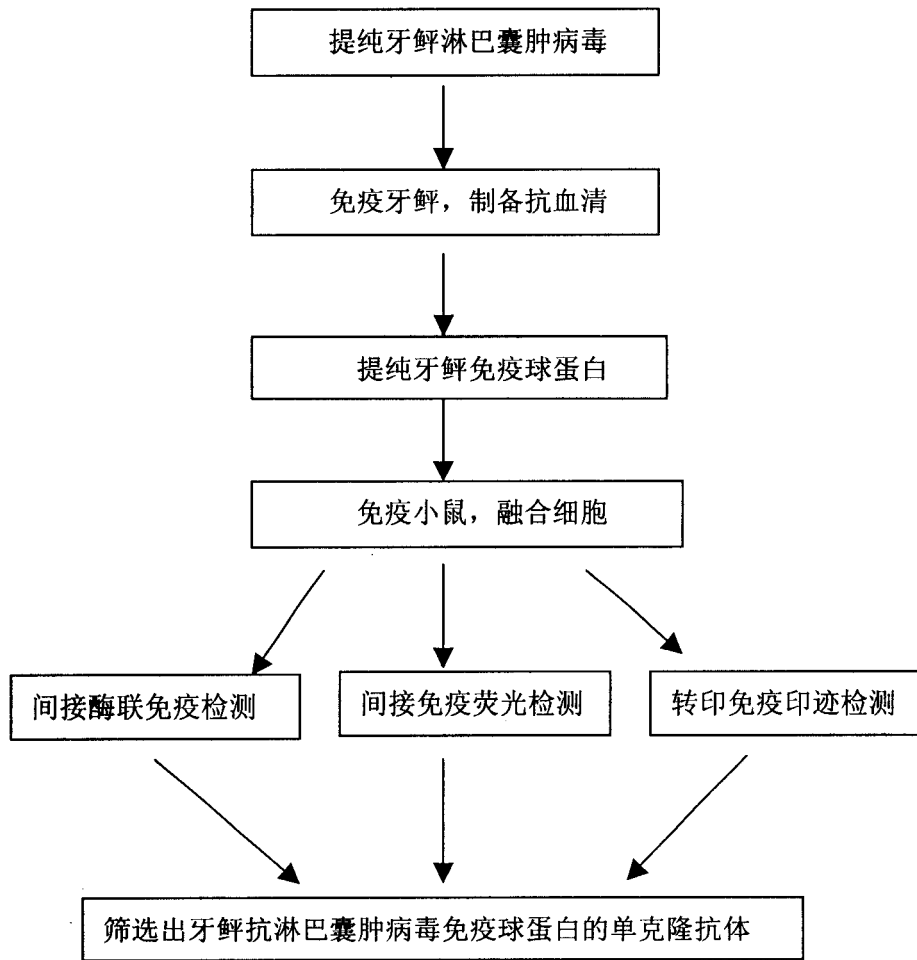


图 1

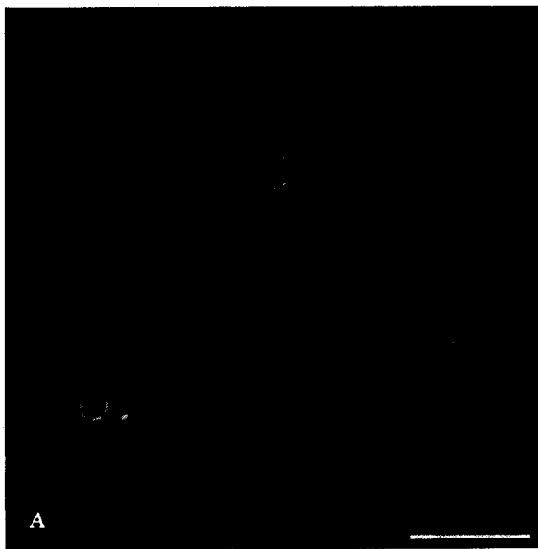


图 2-A

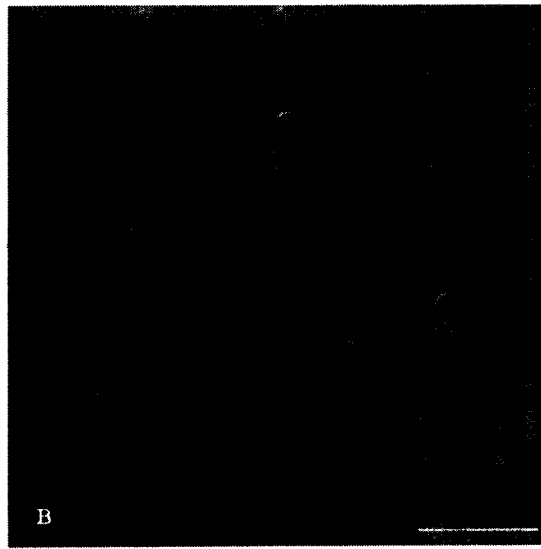


图 2-B

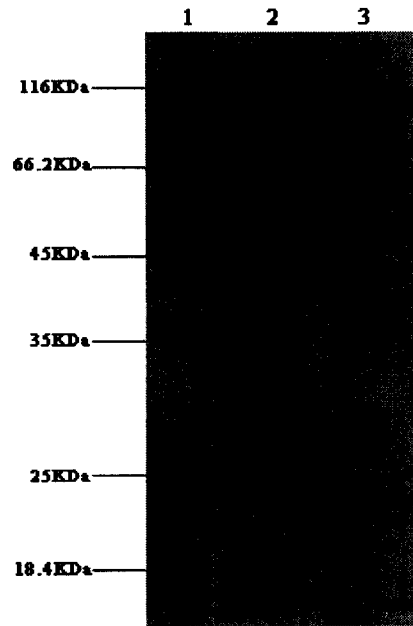


图 3

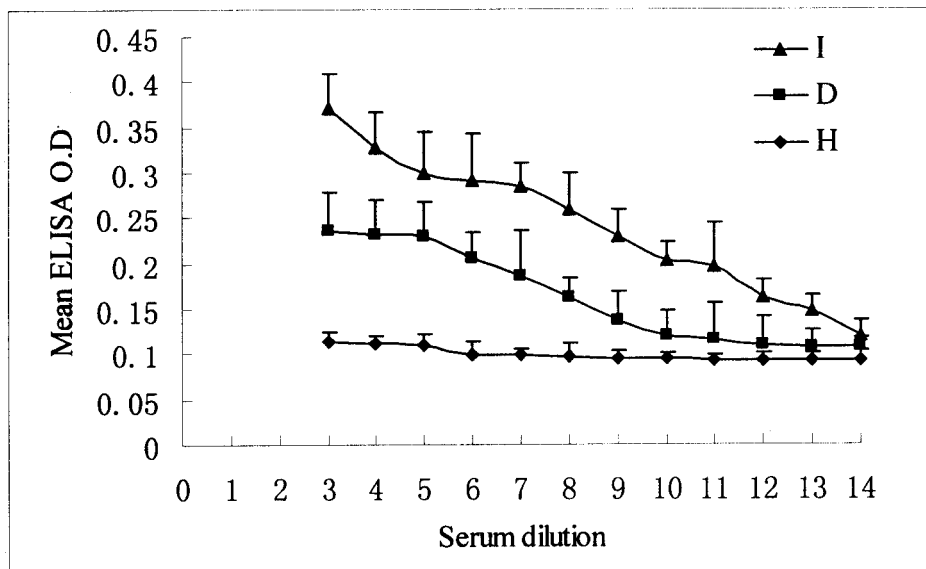


图 4

专利名称(译)	牙鲈抗淋巴囊肿病毒免疫球蛋白的单克隆抗体及其制备方法		
公开(公告)号	CN101003572A	公开(公告)日	2007-07-25
申请号	CN200610045594.3	申请日	2006-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
[标]发明人	战文斌 林颖博 李强		
发明人	战文斌 林颖博 李强		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53		
代理人(译)	韩振东		
其他公开文献	CN100560602C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是牙鲈抗淋巴囊肿病毒(LCDV)免疫球蛋白的单克隆抗体。其是由名称为杂交瘤细胞JF - IgM - H，保藏号为CCTCC - C200631的杂交瘤细胞分泌的。该单抗的制备方法如下：通过福尔马林灭活的LCDV免疫牙鲈制备抗血清，然后提纯该牙鲈免疫球蛋白作为抗原免疫Balb/c小白鼠，应用细胞工程的方法产生融合的杂交瘤细胞，经过免疫学检测方法筛选出该单抗。间接酶联免疫法和间接免疫荧光抗体法综合确定：本发明单抗与牙鲈抗LCDV免疫球蛋白特异性结合反应真实存在；转印免疫印迹法确定：本发明单抗的抗原决定簇位于分子量范围为70 - 80kDa的牙鲈抗LCDV免疫球蛋白的重链上。本发明将作为制备早期检测判断牙鲈感染LCDV及评价LCDV福尔马林灭活疫苗在牙鲈上免疫效果的试剂中的应用。

