



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105296434 A

(43) 申请公布日 2016.02.03

(21) 申请号 201510737022.0

C07K 16/10(2006.01)

(22) 申请日 2015.11.03

G01N 33/577(2006.01)

(83) 生物保藏信息

G01N 33/569(2006.01)

CGMCC No. 10896 2015.06.23

G01N 33/558(2006.01)

(71) 申请人 北京三联博悦生物技术有限公司

G01N 33/543(2006.01)

地址 102200 北京市昌平区科技园区富康路
18号202室

G01N 33/535(2006.01)

申请人 金宇保灵生物药品有限公司

C12R 1/91(2006.01)

(72) 发明人 郑金来 张翀宇 吴园园 刘国英

任旭荣 李蓉 范秀丽 郝金宝

苍枫 刘飞

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限

公司 11322

代理人 鲁兵

(51) Int. Cl.

C12N 5/20(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页

序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

杂交瘤细胞株及其分泌的抗口蹄疫O型病毒
的单克隆抗体与应用

(57) 摘要

本发明杂交瘤细胞株及其分泌的抗口蹄疫O型病毒的单克隆抗体与应用,使用可以诱发机体产生免疫反应的口蹄疫O型(O/Mya98/BY/2010)病毒作为免疫原得到能持续、稳定分泌抗口蹄疫O型(O/Mya98/BY/2010)病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞株1F2,并由该细胞株分泌得到单克隆抗体1F2anti。该单克隆抗体能够特异性地识别口蹄疫O型(O/Mya98/BY/2010)病毒,可用于检测口蹄疫O型(O/Mya98/BY/2010)病毒,并具有高特异性、高灵敏度的优点,可应用在口蹄疫O型(O/Mya98/BY/2010)病毒的检测、疫苗生产、流行病学研究中。

1. 以口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒为免疫原免疫小鼠获得的持续、稳定分泌抗口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 1F2, 保藏编号为 CGMCC No. 10896。

2. 由权利要求 1 所述的杂交瘤细胞株 1F2 CGMCC No. 10896 分泌的单克隆抗体 1F2anti。

3. 根据权利要求 2 所述的单克隆抗体 1F2anti, 其特征在于: 所述单克隆抗体 1F2anti 的重链可变区具有序列表中的 SEQ ID No :1 的氨基酸残基序列或将序列表中 SEQ ID No :1 的氨基酸残基序列经过一至十个氨基酸残基的取代、缺失或添加且可与口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒特异结合的多肽, 轻链可变区具有序列表中的 SEQ ID No :2 的氨基酸残基序列或将序列表中 SEQ ID No :2 的氨基酸残基序列经过一至十个氨基酸残基的取代、缺失或添加且可与口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒特异结合的多肽。

4. 编码权利要求 2 或 3 所述单克隆抗体 1F2anti 的基因 (1F2anti), 其重链可变区编码基因具有序列表中 SEQ ID No :3 的 DNA 序列或编码序列表中 SEQ ID No :1 的 DNA 序列或在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No :3 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列, 其轻链可变区编码基因具有序列表中 SEQ ID No :4 的 DNA 序列或编码序列表中 SEQ ID No :2 的 DNA 序列或在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No :4 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列。

5. 获得权利要求 1 所述杂交瘤细胞株的方法, 包括以下步骤:

- 1) 用口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒作为免疫原免疫动物;
- 2) 分离免疫动物的脾细胞, 将其与骨髓瘤细胞融合, 形成杂交瘤;
- 3) 筛选杂交瘤细胞, 得到杂交瘤细胞株 1F2。

6. 获得权利要求 2 或 3 所述单克隆抗体 1F2anti 的方法, 在权利要求 5 的基础上继续包括以下步骤:

4) 从杂交瘤细胞株 1F2 的培养液或接种杂交瘤细胞株 1F2 的动物的腹水液中分离并纯化出单克隆抗体 1F2anti。

7. 一种检测口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的 ELISA 试剂盒, 包括权利要求 2 或 3 或 4 所述单克隆抗体 1F2anti。

8. 根据权利要求 7 所述试剂盒, 其特征在于, 包括用 1F2anti 作为包被抗体包被的微孔板和用 1F2anti 作为酶标抗体的酶标记抗体工作液;

所述用 1F2anti 作为包被抗体包被的微孔板指的是用 10mM pH7.0-7.4PBS 将 1F2anti 稀释成 0.5-10 μ g/mL, 加入微孔板中, 110 μ l/孔, 置于 2-8°C 过夜; 拍干后, 加入含 1% BSA 的 10mM pH7.0-7.4PBS, 300 μ l/孔, 置于 2-8°C 过夜; 拍干、干燥后真空装入铝箔袋中备用;

所述酶标抗体可用辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酯酶 (ALP) 等标记酶标记抗体, 然后用酶标记抗体稀释液 (配方为: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.296g, NaCl 8.5g, Proclin 300 0.6mL, BSA 10g, 胎牛血清 150mL, 酶稳定剂 5g, Tween-20 0.25mL, 用双蒸水定溶至 1000mL, 调整 pH 值至 7.6-7.8) 稀释成工作液, 工作液的浓度为 0.1-1.0 μ g/mL。

9. 权利要求 7 或 8 所述试剂盒的使用方法, 用于对口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的 ELISA 检测, 是用权利要求 2 或 3 所述单克隆抗体 1F2anti 作为包被抗体及酶标抗体的双抗夹心 ELISA 检测, 包括以下步骤:

- 1) 用单克隆抗体 1F2anti 包被 96 孔微孔板并封闭；
- 2) 加待测样品,洗板；
- 3) 加用辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酯酶 (ALP) 标记的单克隆抗体 1F2anti,洗板；
- 4) 加底物显色；
- 5) 终止反应；
- 6) 测定 OD₄₅₀ 值。

10. 一种检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的金标纸层析试纸,由玻璃纤维膜样品垫、结合物释放垫、吸水垫、硝酸纤维素膜 (NC 膜) 组成,硝酸纤维素膜上设有检测线 (T 线) 和质控线 (C 线),其特征在于：

用浓度为 1-5mg/mL 的权利要求 2 或 3 所述单克隆抗体 1F2anti 包被检测线 (T 线)；用浓度为 1-5mg/mL 的羊抗鼠免疫球蛋白包被质控线 (C 线)；结合物释放垫上包被有胶体金标记的特异性单克隆抗体 1F2anti；所述单克隆抗体 1F2anti 如权利要求 2 或 3 所述。

杂交瘤细胞株及其分泌的抗口蹄疫 O 型病毒的单克隆抗体 与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域中的杂交瘤细胞株及其分泌的单克隆抗体与应用,特别是涉及口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体和分泌该抗体的杂交瘤细胞株以及该抗体在检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒中的应用。

背景技术

[0002] 口蹄疫是由口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 感染引起的偶蹄动物共患的急性、热性、接触性传染病,最易感染的动物是牛、猪、骆驼、羊、鹿等,野猪、野牛等野生动物也易感染此病。口蹄疫在亚洲、非洲和中东以及南美均有流行,在非流行区也有散发病例。

[0003] 口蹄疫发病后一般不致死,但会使病兽的口、蹄部出现大量水疱,高烧不退,使实际畜产量锐减。另外,有个别口蹄疫病毒的变种可传染给人。因此,每次爆发后只能屠宰和集体焚毁染病牲畜以绝后患。由于口蹄疫传播迅速、难于防治、补救措施少,被称为畜牧业的“头号杀手”。我国对口蹄疫的预防主要通过疫苗注射接种,发生口蹄疫的则捕杀。

[0004] FMDV 的免疫是依赖 T 细胞的口蹄疫病毒 (FMDV) 目前有 O、A、C、SAT1、SAT2、SAT3 (即南非口蹄疫病毒 1、2、3 型) 和 Asia1 (亚洲 1 型) 7 个血清型。各型之间几乎没有免疫保护力,感染了一型口蹄疫的动物仍可感染另一型口蹄疫病毒而发病,因此常常用多价疫苗来降低患口蹄疫的风险。FMDV 属于小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 口疮病属 (Aphthovirus),是偶蹄类动物高度传染性疾病 (口蹄疫) 的病原。在病毒的中心为一条单链的正链 RNA,由大约 8000 个碱基组成,是感染和遗传的基础;周围包裹着的蛋白质决定了病毒的抗原性、免疫性和血清学反应能力;病毒外壳为对称的 20 面体。口蹄疫 O 型毒株是国内流行较广的一类亚型,其中,口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒是口蹄疫 O 型的一个毒株。O/Mya98/XJ/2010 株由中国兽医药品监察所提供,属于东南亚拓扑型 (SEA) Mya-98 谱系,该毒株在 BHK21 细胞上遗传稳定,免疫原性好,疫苗的交叉保护性高,每毫升抗原表达量可达 2 微克以上,每毫升 TCID₅₀ 可达 $10^{7.5}$ 以上。

[0005] 疫苗接种是特异性预防 FMDV 的可靠和有效手段,安全有效的疫苗是成功预防、控制乃至最终消灭 FMDV 的先决条件。FMDV 弱毒疫苗和灭活疫苗等常规疫苗都具有良好的免疫原性,在预防和控制 FMDV 的过程中发挥着重要作用。随着分子生物学技术的飞速发展, FMDV 基因工程疫苗如亚单位疫苗、可饲疫苗、合成肽疫苗、蛋白质载体疫苗、基因缺失疫苗、活载体疫苗、核酸疫苗等不断涌现。目前,常见的是口蹄疫多种毒株制备的多价疫苗,如口蹄疫 O 型 (O/GX/09-7) 和口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 混合制备成的双组份疫苗。疫苗生产企业目前常采用蔗糖密度梯度离心法测量口蹄疫病毒的含量,但是无法对多组份疫苗的某种毒株进行单独定量。

[0006] 基于抗原抗体的免疫学检测,因操作简单、灵敏度高、特异性强、仪器设备便宜等优点已经被广泛使用在临床检测上。目前,市场上偶见能够检测口蹄疫抗原的酶联免疫

检测试剂盒,但是大都采用了多克隆抗体制成,如中国农业科学院兰州兽医研究所开发、生产的 0 型口蹄疫 146S 抗原定量 ELISA 检测试剂盒,该试剂盒已经申报专利(申请公布号 CN103076451A),该试剂盒采用了 0 型口蹄疫的兔抗血清和豚鼠抗血清两种多克隆抗体制成,但是无法区分 0 型的不同毒株,如缅甸 98 株(0/Mya98/BY/2010 株)和广西株(0/GX/09-7 株),因而就无法对多组份 0 型疫苗中的每种 0 型口蹄疫 146S 抗原进行单独定量,其主要的原因就在于多克隆抗体针对多种抗原表位,而不同的血清型尤其是同一血清型的不同毒株之间存在相同的抗原表位。因此,采用多克隆抗体去特异性检测口蹄疫不同的毒株是不可能成功的,尤其是同一血清型不同的毒株。

[0007] 单克隆抗体因其针对的抗原位点单一,特异性较好,并且生产的重复性优于多克隆抗体,目前在很多临床检测中被采用。国内偶见有制备口蹄疫单克隆抗体的研究,但尚未见到用于特异性检测口蹄疫 0 型(0/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体的报道。

发明内容

[0008] 本发明的第一个目的是提供用于检测口蹄疫 0 型(0/Mya98/BY/2010) 病毒的杂交瘤细胞株及其产生的单克隆抗体。

[0009] 本发明以口蹄疫 0 型(0/Mya98/BY/2010) 病毒为免疫原免疫小鼠,获得持续、稳定分泌抗口蹄疫 0 型(0/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞株,名称为 1F2,该细胞株已于 2015 年 06 月 23 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC No.10896。

[0010] 由杂交瘤细胞株 1F2 分泌的单克隆抗体命名为 1F2anti,来源于小鼠属小鼠(*Mus musculus*),也属于本发明的保护范围。

[0011] 1F2anti 的重链可变区具有序列表中的 SEQ ID No :1 的氨基酸残基序列或将序列表中 SEQ ID No :1 的氨基酸残基序列经过一至十个氨基酸残基的取代、缺失或添加且可与口蹄疫 0 型(0/Mya98/BY/2010) 病毒特异结合的多肽,轻链可变区具有序列表中的 SEQ ID No :2 的氨基酸残基序列或将序列表中 SEQ ID No :2 的氨基酸残基序列经过一至十个氨基酸残基的取代、缺失或添加且可与口蹄疫 0 型(0/Mya98/BY/2010) 病毒特异结合的多肽。

[0012] 序列表中的 SEQ ID No :1 由 113 个氨基酸残基组成,序列表中的 SEQ ID No :2 由 98 个氨基酸残基组成。

[0013] 编码单克隆抗体 1F2anti 的基因(1F2anti),其重链可变区编码基因具有序列表中 SEQ ID No :3 的 DNA 序列或编码序列表中 SEQ ID No :1 的 DNA 序列或在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No :3 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列,其轻链可变区编码基因具有序列表中 SEQ ID No :4 的 DNA 序列或编码序列表中 SEQ ID No :2 的 DNA 序列或在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No :4 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列;

[0014] 所述高严谨条件为在 $0.1 \times \text{SSPE}$ (或 $0.1 \times \text{SSC}$)、0.1% SDS 的溶液中,65℃ 条件下杂交并洗膜。

[0015] 序列表中的 SEQ ID No :3 由 339 个碱基组成,编码具有序列表中 SEQ ID No :1 的氨基酸残基序列的蛋白质,序列表中的 SEQ ID No :4 由 294 个碱基组成,编码具有序列表中 SEQ ID No :2 的氨基酸残基序列的蛋白质。

[0016] 含有本发明基因 1F2anti 的表达载体、转基因细胞系和宿主菌均属于本发明的保

护范围。

[0017] 扩增本发明基因 1F2anti 中任一片段的引物对也在本发明的保护范围之内。

[0018] 获得本发明的杂交瘤细胞株 1F2 的方法,可包括以下步骤:

[0019] 1) 用口蹄疫 0 型 (0/Mya98/BY/2010) 病毒作为免疫原免疫动物;

[0020] 2) 分离免疫动物的脾细胞,将其与骨髓瘤细胞融合,形成杂交瘤;

[0021] 3) 筛选杂交瘤细胞,得到杂交瘤细胞株 1F2。

[0022] 获得本发明单克隆抗体 1F2anti 的方法,在上述步骤的基础上增加以下步骤:

[0023] 4) 从杂交瘤细胞株 1F2 的培养液或接种杂交瘤细胞株 1F2 的动物的腹水液中分离并纯化出单克隆抗体 1F2anti。

[0024] 在上述方法中,步骤 1) 中的口蹄疫 0 型 (0/Mya98/BY/2010) 病毒可为活病毒或灭活病毒,优选为灭活病毒,浓度为 10-1000 $\mu\text{g/mL}$;用于制备单克隆抗体的免疫动物可为小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、猪、驴、马等哺乳动物,优选为小鼠。

[0025] 步骤 2) 中当被免疫动物的血清抗体水平达到峰值时,可分离动物的脾细胞并制备成单细胞悬液。必要时,可使用免疫吸附方法筛选脾细胞,并在适当的融合剂(如聚乙二醇)的诱导下与骨髓瘤细胞(优选为小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0)融合以形成杂交瘤。

[0026] 步骤 3) 中可以在选择性培养基(如 HAT 培养基)中培养以筛选融合的杂交瘤细胞,并进一步可使用流式细胞术、Western 印迹法、免疫沉淀法等方法鉴定所需的阳性抗性细胞株。

[0027] 步骤 4) 中可于体外(如在组织培养瓶或多孔纤维反应器中)或体内(小鼠腹水)培养分泌口蹄疫 0 型 (0/Mya98/BY/2010) 病毒单克隆抗体 1F2anti 的杂交瘤细胞株 1F2,并从细胞培养液或小鼠腹水液中收集和纯化出单克隆抗体 1F2anti。

[0028] 本发明的第二个目的是提供一种单克隆抗体 1F2anti 的应用,提出口蹄疫 0 型 (0/Mya98/BY/2010) 病毒的 ELISA 检测方法,该检测是用口蹄疫 0 型 (0/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体 1F2anti 作为包被抗体及酶标抗体的双抗夹心 ELISA 检测方法。

[0029] 具体来讲,所述双抗夹心 ELISA 检测,可包括以下步骤:

[0030] 1) 用单克隆抗体 1F2anti 包被酶联板,封闭经包被的酶联板;

[0031] 2) 加待测样品,洗板;

[0032] 3) 加辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酯酶 (ALP) 标记的单克隆抗体 1F2anti,洗板;

[0033] 4) 加底物显色;

[0034] 5) 终止反应;

[0035] 6) 测定 OD_{450} 值。

[0036] 上述检测方法中的反应条件及试剂均可按照常规方法进行选择。

[0037] 步骤 3) 中单克隆抗体 1F2anti 的标记酶优选为辣根过氧化物酶,可通过戊二醛法或过碘酸法将酶交联在单克隆抗体 1F2anti 上。

[0038] 本发明的第三个目的是提供一种检测口蹄疫 0 型 (0/Mya98/BY/2010) 病毒的 ELISA 试剂盒。

[0039] 本发明所提供的检测口蹄疫 0 型 (0/Mya98/BY/2010) 病毒的 ELISA 试剂盒,包括用 1F2anti 作为包被抗体包被的微孔板和用 1F2anti 作为酶标抗体的酶标记抗体工作液。

[0040] 所述用 1F2anti 作为包被抗体包被的微孔板指的是用 10mM pH7.0-7.4PBS 将 1F2anti 稀释成 0.5-10 $\mu\text{g/mL}$, 加入微孔板中, 110 μL /孔, 置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 拍干后, 加入含 1% BSA 的 10mM pH7.0-7.4PBS, 300 μL /孔, 置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 拍干、干燥后真空装入铝箔袋中备用。

[0041] 所述酶标抗体可用辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酯酶 (ALP) 等标记酶标记抗体, 然后用酶标记抗体稀释液 (配方为: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.296g, NaCl 8.5g, Proclin 3000.6mL, BSA 10g, 胎牛血清 150mL, 酶稳定剂 5g, Tween-200.25mL, 用双蒸水定溶至 1000mL, 调整 pH 值至 7.6-7.8) 稀释成工作液, 工作液的浓度为 0.1-1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0042] 所述试剂盒还可包括显色液 A 液、显色液 B 液和终止液, 所述显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲溶液, 所述显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺溶液, 所述终止液为 H_2SO_4 溶液。

[0043] 此外, 为方便检测, 所述试剂盒还可包括: 稀释液, 如 pH7.0-7.410mM PBS 缓冲溶液; 洗涤液, 如 PBST 等常规的洗涤试剂。

[0044] 为便于观测结果, 所述试剂盒还可包括标准口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒阳性血清 (阳性对照) 和标准口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒阴性血清 (阴性对照), 可用稀释液作为阴性对照使用。

[0045] 本发明的第四个目的是提供一种检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的金标纸层析试纸条或测试卡。

[0046] 用于检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的金标纸层析试纸由玻璃纤维膜样品垫、结合物释放垫、吸水垫、硝酸纤维素膜 (NC 膜) 组成, 硝酸纤维素膜上设有检测线 (T 线) 和质控线 (C 线)。

[0047] 金标纸层析试纸的制备方法包括以下步骤:

[0048] 1) 包被硝酸纤维素膜 (NC 膜)

[0049] 用浓度为 1-5mg/mL 的单克隆抗体 1F2anti 包被检测线 (T 线); 用浓度为 1-5mg/mL 的羊抗鼠免疫球蛋白 (购自北京博尔西科技有限公司) 包被质控线 (C 线); 用 BIODOT 公司 XYZ3000 喷膜机将单克隆抗体 1F2anti 和羊抗鼠免疫球蛋白分别喷于 300mm 长、25mm 宽的硝酸纤维素膜上, 形成相互分离的检测线和质控线, 检测线和质控线间距为 0.3-1.0cm, 通常选择 0.5cm。37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 1 小时后备用。

[0050] 2) 结合物释放垫的制备

[0051] 2.1 用胶体金标记单克隆抗体 1F2anti, 方法为: 在磁力搅拌下, 向三角瓶中加入 155mL 纯化水, 煮沸。加入 1% 四氯化金溶液 5mL, 煮沸。再加入 1% 柠檬酸三钠溶液 7mL, 煮沸 5 分钟。冷却后保存于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 。取 1 毫升胶体金溶液于离心管中。加入 15 μL 0.2M 碳酸钾溶液, 室温静止 5min。加入 10 μL 抗体, 混匀后静置 30min。加入 10 μL 20% BSA 溶液, 平衡 5min。加入 10 μL 20% PEG20000 溶液, 平衡 30min; 用离心机 10000rpm, 离心 10min, 去上清液。加入 100 μL 金标复溶液 (含有 2% 蔗糖、1% 酪蛋白、0.5% BSA、0.1% Triton X100、0.1% SDS 的硼酸缓冲液), 复溶后备用。

[0052] 2.2 制备结合物释放垫: 结合物释放垫的材质为玻璃纤维膜, 其上包被有胶体金标记的特异性单克隆抗体 1F2anti, 将复溶后的金子 1:4 稀释后按照 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的速度喷膜, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 2 小时干燥, 备用。

[0053] 3) 制备金标纸层析试纸

[0054] 在 PVC 背板上先黏贴硝酸纤维素膜, 在靠近硝酸纤维素膜质控线的一端黏贴吸水垫, 在靠近测试线一端黏贴结合物释放垫和样品垫, 得到用于检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒金标纸层析试纸, 然后可按所需大小进行切割, 得到用于检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒金标纸层析测试条, 加干燥剂后密封保存。

[0055] 如将上述步骤制备的测试条装入塑料卡中, 制成测试卡, 并组装成试剂盒, 该试剂盒对应于样品垫的部位设有点样口, 对应于检测线和质控线的部位设有观测窗。

[0056] 本发明使用可以诱发机体产生免疫反应的口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒作为免疫原, 采用常规杂交瘤技术经过细胞融合并筛选得到能持续、稳定分泌抗口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 1F2, 并由该细胞株分泌得到单克隆抗体 1F2anti。本发明的单克隆抗体能够特异性地识别口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒, 可用于检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒, 并具有高特异性、高灵敏度的优点。实验证明, 本发明的单克隆抗体可以准确检测样品中口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的水平, 而不与口蹄疫 O 型 (O/GX/09-7)、亚洲 1 型 (JSL/06)、A 型 (Re-A/WH/09) 病毒发生交叉反应。本发明将在口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的检测、疫苗生产、流行病学研究中发挥重要作用, 应用前景广阔。

[0057] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

附图说明

[0058] 图 1 为抗口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体 1F2anti 纯度 8% 的 SDS-PAGE 电泳检测结果;

[0059] 图 2 为抗口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体 1F2anti 构象型表位的 Western Blot 检测结果;

[0060] 图 3 为抗口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体 1F2anti 的亚型鉴定结果;

[0061] 图 4 为用单克隆抗体 1F2anti 及 ELISA 双抗体夹心法检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的灵敏度的拟合曲线;

[0062] 图 5 为胶体金纸层析试纸条正面结构图;

[0063] 图 6 为胶体金试纸条组装示意图;

[0064] 图 7 为用单克隆抗体 1F2anti 制备的金标纸层析试纸盒检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的灵敏度检测结果。

具体实施方式

[0065] 下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法, 具体步骤可参见: 《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》(Sambrook, J., Russell, David W., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, 2001, NY, Cold Spring Harbor)。

[0066] 所述百分比浓度如无特别说明均为质量 / 质量 (W/W, 单位 g/100g) 百分比浓度、质量 / 体积 (W/V, 单位 g/100mL) 百分比浓度或体积 / 体积 (V/V, 单位 mL/100mL) 百分比浓度。

[0067] 实施例中描述到的各种生物材料的取得途径仅是提供一种实验获取的途径以达到具体公开的目的,不应成为对本发明生物材料来源的限制。事实上,所用到的生物材料的来源是广泛的,任何不违反法律和道德伦理能够获取的生物材料都可以按照实施例中的提示替换使用。

[0068] 实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,实施例将有助于理解本发明,但是本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0069] 实施例 1、获得持续、稳定分泌抗口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞

[0070] 杂交瘤细胞株 1F2 的获得方法,包括以下步骤:

[0071] 1、动物免疫

[0072] 1) 基础免疫:以口蹄疫 (O/Mya98/BY/2010) 病毒(由金宇保灵生物制品有限公司提供)作为免疫原,采用蔗糖密度梯度离心法测定,纯度 $\geq 85\%$,浓度为 $10-1000 \mu\text{g/mL}$ 。必要时,可用超滤管浓缩病毒抗原以提高病毒含量,浓缩后抗原与福氏完全佐剂(购于 Sigma 公司)等体积混合并充分乳化,多点皮下注射乳化液,每只 Balb/c 小鼠(8-12 周龄,雌性,SPF 级动物培养,购自军事医学科学院实验动物中心)每次注射量为 $150 \mu\text{g}$ 。

[0073] 2) 加强免疫:将浓缩后抗原与福氏不完全佐剂(购于 Sigma 公司)等体积混合并充分乳化,多点皮下注射乳化液,每只 Balb/c 小鼠每次注射量为 $200 \mu\text{g}$ 。在进行细胞融合前 3 天,腹腔注射含 $200 \mu\text{g}$ 抗原的生理盐水溶液,以进一步增强免疫效果。

[0074] 2、杂交瘤细胞的制备和筛选

[0075] 用常规方法收集小鼠的脾细胞,将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞按 10:1 的比例在 500g/L PEG4000(融合剂,购于 Sigma 公司)的诱导下进行融合。用 HAT(购自生兴生物技术(南京)有限公司)选择性培养液培养,培养条件为 5% 二氧化碳、 37°C 。融合后 10-15 天,取上清采用间接 ELISA 法筛选分泌抗口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的杂交瘤细胞株,间接 ELISA 法的操作步骤为:用 $110 \mu\text{L}$ 浓度为 $4 \mu\text{g/mL}$ 的口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒包板,拍干后,用 1% BSA 封闭液(100mL pH7.4 10mM PBS 中加入 1g BSA,BSA 购于 Sigma 公司)封闭,以免疫小鼠血清 1:2000,无克隆生长的培养基上清和正常小鼠血清作为阴性对照,每孔加 1:2000HRP- 山羊抗小鼠 IgG(购自美国 ABCAM 公司) $100 \mu\text{L}$,最后测定 450nm OD 值,以 OD_{450} 值大于阴性对照 2 倍为阳性判断依据。

[0076] 对所得阳性克隆株采用有限稀释法进行亚克隆,具体方法是:

[0077] 1) 取出抗体阳性孔细胞,用 HT 培养液制成细胞悬液。并取样进行台盼兰染色,计数。

[0078] 2) 用 HT 培养液将细胞稀释成 200 个 $/\text{mL}$ 、 40 个 $/\text{mL}$ 、 20 个 $/\text{mL}$ 和的悬液。

[0079] 3) 用吸管将细胞悬液分别种入微量培养板,每孔 0.05mL ,细胞含量分别为 10 个/孔、 2 个/孔、 1 个/孔和 0.5 个/孔。

[0080] 4) 5% CO_2 饱和湿度, 37°C 培养。

[0081] 5) 每天用倒置显微镜观察克隆生长情况,选择只有一个集落生长的孔,弃掉两个以上和没有细胞生长的孔。

[0082] 6) 克隆大量繁殖后,布满孔底的 $1/3-1/2$ 时,通过间接 ELISA 法测培养液上清抗体,选择阳性克隆,并传 4-6 代就可以建成克隆株。

[0083] 3、杂交瘤细胞的获得

[0084] 重复步骤 2, 进行 2 次细胞融合, 经过 4 次亚克隆和间接 ELISA 筛选, 得到 5 株针对口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒可稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞, 并根据克隆产生位置分别编号为 1F2、2B4、5C3、4H9、7F5。

[0085] 4、杂交瘤细胞所得单抗的性能检测

[0086] 1) 细胞培养液上清效价测定: 用间接 ELISA 法 (方法见步骤 2) 检测上述杂交瘤细胞培养上清的效价, 结果如表 1 所示, 效价为: 1:10-1:120, 表明培养上清中均含有目标抗体, 其中 2B4 抗体效价略低。

[0087] 表 1 杂交瘤细胞培养上清的效价

[0088]

	细胞株 1F2	细胞株 2B4	细胞株 5C3	细胞株 4H9	细胞株 7F5
细胞培养 上清效价	1:60	1:8	1:64	1:120	1:100

[0089] 2) 小鼠腹水效价测定: 用间接 ELISA 法 (方法见步骤 2) 检测上述杂交瘤细胞制备的腹水效价, 结果如表 2 所示, 效价为: 1:1000-1:1000000, 表明小鼠腹水中均产生了目标抗体, 抗体效价除 2B4 外其余 4 种均满足需要。

[0090] 表 2 杂交瘤细胞腹水的效价

[0091]

	细胞株 1F2	细胞株 2B4	细胞株 5C3	细胞株 4H9	细胞株 7F5
小鼠腹水效价	1:32768	1:1024	1:8192	1:65536	1:65536

[0092] 3) 小鼠腹水抗体特异性验证: 用间接 ELISA 法 (方法见步骤 2) 检测上述杂交瘤细胞制备的腹水的特异性, 即分别采用口蹄疫不同的毒株包被微孔板, 将腹水用 pH7.410mM PBS 稀释 100 倍后检测。结果如表 3 所示, 其中特异性抗体为 1F2 和 2B4 克隆, 另外三种为非特异性抗体。由于 2B4 克隆抗体效价较低, 故选择 1F2 抗体用于 ELISA 试剂盒和胶体金检测试剂的开发和制备

[0093] 表 3 杂交瘤细胞培养上清的效价

[0094]

包被抗原	OD _{450nm}				
	细胞株 1F2	细胞株 2B4	细胞株 5C3	细胞株 4H9	细胞株 7F5
口蹄疫广西毒株 (0/GX/09-7)	0.057	0.075	1.873	2.656	1.694
口蹄疫 A 型 (Rec-A/WH/09)	0.021	0.066	2.471	2.688	1.820
亚洲 1 型 (JSL06)	0.091	0.071	1.376	1.534	1.528
目标毒株 (0/Mya/BY/2010)	3.054	0.965	2.732	2.965	2.112

[0095] 5、杂交瘤细胞的传代培养

[0096] 将 1F2 杂交瘤细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 (含有 100U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素) 中继续进行培养、传代, 培养到第 10 代后, 杂交瘤细胞株 1F2 仍然能够生长良好、稳定传代, 培养液上清效价仍然可以达到 1:50 以上, 表明获得了能够稳定传代, 并可以持续、稳定分泌抗口蹄疫 O 型 (0/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0097] 6、保存杂交瘤细胞

[0098] 获得持续、稳定分泌抗口蹄疫 O 型 (0/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞后, 必须保存一部分杂交瘤细胞, 这是因为在连续传代的过程中, 可能产生突变或染色体的漂移以至丧失固有特性或丢失产生抗体的特性; 另外, 在长期的培养过程中, 难免不发生污染以至于毁灭。

[0099] 保存方法包括以下步骤:

[0100] 1) 去掉细胞培养瓶中旧的培养液, 加入含有 10% 胎牛血清的 RPM1640 培养基, 使细胞悬浮。

[0101] 2) 1000r/min 离心 10min, 去上清。细胞沉淀用细胞冻存液 (二甲基亚砜: 胎牛血清: RPM1640 = 1:2:7) 复溶制成悬液, 浓度 5.0×10^5 细胞/mL。

[0102] 3) 取样, 台盼兰染色, 计数活细胞, 应在 95% 以上。具体地:

[0103] 称取 4g 台盼蓝, 加少量蒸馏水研磨, 加双蒸水至 100mL, 用滤纸过滤, 4 度保存。使用时, 用 pH7.410mM PBS 稀释至 0.4%。制备单细胞悬液, 并作适当稀释。将细胞悬液与 0.4% 台盼蓝溶液以 9:1 混合混匀 (终浓度 0.04%)。在三分钟内, 镜下观察, 死细胞被染成明显的蓝色, 而活细胞拒染呈无色透明状。计算活细胞率 (%) = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) $\times 100\%$ 。

[0104] 4) 将细胞无菌分装至 1.8mL 细胞冻存管 (购自浙江拱东医疗科技有限公司), 每瓶 0.5mL-1.0mL, 拧紧瓶盖。

[0105] 5) 细胞冻存: 4℃ 放置 2 小时, 然后 -20℃ 再放置 2 小时, 之后液氮罐气态部分 (-70℃) 放置 2 小时, 最后转入液氮长期保存。

[0106] 按以上方法, 以口蹄疫 O 型 (0/Mya98/BY/2010) 病毒为免疫原免疫小鼠, 获得了持续、稳定分泌抗口蹄疫 O 型 (0/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 名称为

1F2。该细胞株已于 2015 年 06 月 23 日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC No. 10896。

[0107] 实施例 2、大量制备抗口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体

[0108] 一、单克隆抗体的大量制备及纯化

[0109] 1、采用动物体内诱生单克隆抗体法大量制备单抗:选择成年 BALB/c 小鼠,腹腔接种降植烷,每只小鼠 0.5mL。7-10 天后腹腔接种第 16 代杂交瘤细胞 1F2,每只小鼠 2×10^6 - 3×10^6 个。间隔 5 天后,待腹部明显膨大,以手触摸时,皮肤有紧张感,即可用 9 号针头采集腹水。

[0110] 2、抗体纯化:将腹水离心 (10000r/min 30 分钟),除去细胞成分和其它的沉淀物,收集上清。将上清用 15-30 倍体积的 pH 7.0-7.610mM PBS (配方:NaH₂PO₄ • 2H₂O 0.296g, Na₂HPO₄ • 12H₂O 2.9g, 双蒸水定溶至 1000mL,测定 pH 值为 7.2-7.4) 稀释,用 Protein A 亲和层析柱 (GE 公司,货号为 29-0491-04) 进行亲和纯化,上柱液为 pH 7.0-7.610mM 的 PBS 缓冲液,柱层析洗脱液为 pH 3.5100mM 的柠檬酸缓冲液 (配方:一水柠檬酸 21g 加入 1000mL 去离子水中,用 5M NaOH 或 4M HCl 调整 pH 值至 3.5),洗脱下来的抗体尽快用 1M pH9.6Tris-HCl 调整 pH 值至中性,得到抗口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体,命名为 1F2anti。

[0111] 二、抗体鉴定

[0112] 1、抗体纯度鉴定

[0113] 对抗口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体 1F2anti 进行纯度 8% SDS-PAGE 电泳鉴定。

[0114] 结果如图 1 (泳道 1F2 为单克隆抗体 1F2anti,泳道 M 为蛋白分子量标准 (kDa)) 所示,无明显杂带,单克隆抗体 1F2anti 的纯度在 85% 以上,表明该纯度良好,可以满足需求。

[0115] 2、抗体构象型表位验证

[0116] 常规 Western Blot 检测方法检测抗口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体 1F2anti 所针对的表位是构象型 (表示该抗体针对的抗原位点为空间结构) 还是线性 (表示该抗体针对的抗原位点为线性结构),方法为:使用 150 μg 灭活口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒进行还原性 8% SDS-PAGE 电泳,湿转法转至 PVDF 膜上,使用纯化的单克隆抗体 1F2anti 进行 Western Blot 杂交检测。

[0117] 结果如图 2 所示,其中 M 为蛋白分子量标准 (kDa),泳道 3 和 4 为单克隆抗体 1F2anti,泳道 1、2 和 5 为阳性对照 (具体为在单克隆抗体制备过程中产生免疫小鼠的阳性尾血,属于多克隆抗体,见实施例 1),从该图看出,单克隆抗体 1F2anti 为构象型表位。

[0118] 3、抗体类及亚类鉴定

[0119] 采用间接 ELISA 法,使用抗小鼠各种 Ig 亚型的抗体鉴定杂交瘤细胞 1F2 分泌的抗口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的单克隆抗体 1F2anti 的 Ig 亚型。

[0120] 结果如图 3 所示,单克隆抗体 1F2anti 为 IgG1。

[0121] 三、单克隆抗体 1F2anti 的可变区序列测定

[0122] 提取杂交瘤细胞 1F2 的 mRNA,反转录为 cDNA,使用可变区通用引物进行高保真 PCR 扩增,将 PCR 扩增片段插入到 T 载体内进行 DNA 序列测定。DNA 序列测定结果:编码单克隆抗体 1F2anti 的基因 (1F2anti),其重链可变区编码基因具有序列表中 SEQ ID No:3 的 DNA

序列或编码序列表中 SEQ ID No :1 的 DNA 序列或在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No :3 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列,其轻链可变区编码基因具有序列表中 SEQ ID No :4 的 DNA 序列或编码序列表中 SEQ ID No :2 的 DNA 序列或在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No :4 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列。将获得的 DNA 序列翻译成蛋白质的氨基酸序列。1F2anti 的重链可变区具有序列表中的 SEQ ID No :1 的氨基酸残基序列或将序列表中 SEQ ID No :1 的氨基酸残基序列经过一至十个氨基酸残基的取代、缺失或添加且可与口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒特异结合的多肽,轻链可变区具有序列表中的 SEQ ID No :2 的氨基酸残基序列或将序列表中 SEQ ID No :2 的氨基酸残基序列经过一至十个氨基酸残基的取代、缺失或添加且可与口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒特异结合的多肽。上述序列在 NCBI 数据库进行比对后未显示有相同序列。

[0123] 实施例 3、用单克隆抗体 1F2anti 及 ELISA 双抗体夹心法检测口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒

[0124] 一、用单克隆抗体 1F2anti 及 ELISA 双抗体夹心法检测不同浓度的口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒

[0125] 有文献 (Number and molecular weights of Food-and-Mouth Disease Virus Capsid Proteins and the Effects of Maleylation, Journal of Virology, 1971, Vol7, No . 2, P250-259) 记载,口蹄疫病毒的膜蛋白 (VP1、VP2、VP3 和 VP4) 具有多个拷贝,因此本发明以单克隆抗体 1F2anti 既为包被抗体又为标记抗体来特异性的检测口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒。

[0126] 用单克隆抗体 1F2anti 及 ELISA 双抗体夹心法检测口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒,检测方法包括以下步骤:

[0127] 1) 包被微孔板:将单克隆抗体 1F2anti 用 pH 7.0-7.4 10mM PBS 缓冲溶液稀释成 4 μ g/mL,在酶标板的每孔加 110 μ L,4 $^{\circ}$ C 下包被过夜;倾去包被液,拍干,然后在每孔中加入 300 μ L 1% BSA (在 pH 7.0-7.4 10mM PBS 缓冲溶液中),放入 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜后,拍干,干燥,真空包装后备用。

[0128] 2) 酶标记抗体:采用过碘酸钠法用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记单克隆抗体 1F2anti,具体方法为:称取 3mg HRP 溶解于 1mL 蒸馏水中。于上液中加入 0.12mL 新配的 0.1M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌 20 分钟。将上述溶液装入透析袋中,对 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液透析,4 $^{\circ}$ C 过夜。加 30 μ L 0.2M pH9.5 碳酸盐缓冲液,使透析后的 HRP 的 pH 升高到 9.0-9.5,然后立即加入溶解在 1mL 0.01M 碳酸盐缓冲液中的 4mg IgG,室温避光轻轻搅拌 2 小时。加 0.12mL 新配的 5mg/mL NaBH₄溶液,混匀,再置 4 $^{\circ}$ C 2 小时。将上述溶液装入透析袋中,对 0.01M pH7.2 PBS 透析,4 $^{\circ}$ C 过夜。取出后加入等体积优质甘油,分装,-20 $^{\circ}$ C 保存,即为 1F2-HRP。用酶标记抗体稀释液按照一定比例稀释即为酶标记抗体工作液。酶标记抗体稀释液的配方为:Na₂HPO₄·12H₂O, 2.9g;NaH₂PO₄·2H₂O, 0.296g;NaCl, 8.5g;Proclin 300, 0.6mL;BSA, 10g;胎牛血清, 150mL;酶稳定剂, 5g;Tween-20, 0.25mL;双蒸水,定溶至 1000mL;调整 pH 至 7.6-7.8。

[0129] 3) 与待检样品反应:向酶标板中分别加入口蹄疫 0 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒梯度稀释液 100 μ L/孔,病毒浓度见表 3,37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。

[0130] 4) 洗板并加入酶标记抗体:用 PBST 洗液 (配方:Na₂HPO₄·12H₂O 58g,NaH₂PO₄·2H₂O

5.92g, NaCl 170g, Tween-205.0mL, Proclin 3000.6mL, 用双蒸水定溶至 1000mL, 调整 pH 值至 7.2-7.4; 使用前用双蒸水稀释 20 倍) 洗板 5 次后, 再加入 1F2-HRP (1:1000-1:8000 稀释) 100 μ L/孔, 37°C 温育 0.5 小时。

[0131] 5) 洗板与显色: 用 PBST 洗板 5 次后加入显色液 A (配方为: 无水乙酸钠 4.5g, 冰醋酸 1.2mL, 过氧化脲 0.8g, 用双蒸水定溶至 1000mL。)、显色液 B (配方为: 柠檬酸 1.62g, EDTA-2Na 0.372g, 甘油 100mL, 四甲基联苯胺盐酸盐 0.50g, 用双蒸水定溶至 1000mL。) 各 50 μ L/孔进行显色, 37°C 温育 15min。

[0132] 6) 终止反应与测量: 加入终止液 (配方为: 1000mL 双蒸水中含有 98% 硫酸 27.8mL。), 50 μ L/孔, 读数 OD₄₅₀。

[0133] 检测结果如表 4 所示, 可以看出该试剂盒能够检测 15.6-500ng/mL 范围的抗原, 在该区间内线性满足需要, 表明该试剂盒具有良好的线性。

[0134] 表 4 用单克隆抗体 1F2anti 及 ELISA 双抗体夹心法检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的结果

[0135]

试验组	1	2	3	4	5	6	7	8	9
病毒浓度 ng/mL	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	阴性对照	空白对照
OD ₄₅₀	2.385	1.576	0.77	0.405	0.178	0.086	0.042	0.036	0.041

[0136] 二、用单克隆抗体 1F2anti 及 ELISA 双抗体夹心法检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的灵敏度检测

[0137] 用单克隆抗体 1F2anti 及 ELISA 双抗体夹心法检测不同浓度的口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒, 以确定检测方法的灵敏度, 检测方法与步骤一相同。

[0138] 不同浓度口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的检测结果如表 4 所示, 灵敏度的拟合曲线如图 4 (横坐标表示以 10 为底的浓度的对数, 纵坐标表示以 10 为底的 OD 值的对数) 所示, 可以看出能够将 15.6ng/mL 的抗原与阴性对照区分开 (OD 值是阴性对照的 2 倍以上), 而 7.8ng/mL 的 OD 值与阴性对照区分不大, 因此判断该试剂盒的检测灵敏度可达 15.6ng/mL, 表明该试剂盒具有较高的灵敏度。

[0139] 三、用单克隆抗体 1F2anti 及 ELISA 双抗体夹心法检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的特异性检测

[0140] 用单克隆抗体 1F2anti 及 ELISA 双抗体夹心法检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒、口蹄疫 O 型 (O/GX/09-7)、亚洲 1 型 (JSL/06) 和 A 型 (Re-A/WH/09) 病毒 (病毒均用样品稀释液稀释成 4000ng/mL (样品稀释液配方: Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.9g; NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0.296g; NaCl, 8.5g; Proclin 300, 0.6mL; BSA, 10g; 胎牛血清, 150mL; 硫酸庆大霉素, 2 支 (8 万单位/支); 双蒸水, 定溶至 1000mL; 调整 pH 至 7.6-7.8。过滤除菌, 2-8°C 保存), 以确定检测方法的特异性, 检测方法与步骤一相同。

[0141] 口蹄疫 O 型 (O/GX/09-7)、亚洲 1 型 (JSL/06) 和 A 型 (Re-A/WH/09) 病毒检测结果呈阴性, 无交叉反应, 口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒检测结果呈阳性, 说明以单克隆抗体 1F2anti 同时为包被抗体和标记抗体, 采用 ELISA 双抗体夹心法能够特异性地识别口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒, 与口蹄疫 O 型 (O/GX/09-7)、亚洲 1 型 (JSL/06) 和 A

型 (Re-A/WH/09) 病毒等其它病毒无任何反应。

[0142] 四、制备用 ELISA 双抗体夹心法检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的试剂盒

[0143] 以单克隆抗体 1F2anti 作为包被抗体和标记抗体,用 ELISA 双抗体夹心法检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的试剂盒包括以下试剂:

[0144] 1) 预包被微孔板:预先用单克隆抗体 1F2anti 按照 $4\mu\text{g/mL}$ 的浓度预先包被、封闭,并密封保存在真空铝箔袋中,每个试剂盒一块 96 孔的微孔板;

[0145] 2) 酶标记抗体工作液:预先用辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酯酶 (ALP) 标记的 1F2anti 抗体,并用酶标记抗体稀释液稀释成合适浓度作为工作液,通常为 $0.1\text{--}1.0\mu\text{g/mL}$,每个试剂盒 10.0mL 。

[0146] 酶标记抗体稀释液配方为: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.9g ; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.296g ; NaCl , 8.5g ; Proclin 300, 0.6mL ; BSA, 10g ; 胎牛血清, 150mL ; 酶稳定剂 (购自上海西宝生物科技有限公司), 5g ; Tween-20, 0.25mL ; 双蒸水,定溶至 1000mL ; 调整 pH 至 $7.6\text{--}7.8$ 。

[0147] 3) 稀释液:用于标准品和待测样品的稀释,其配方为 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.9g ; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.296g ; NaCl , 8.5g ; Proclin 300, 0.6mL ; BSA, 10g ; 胎牛血清, 150mL ; 硫酸庆大霉素, 2 支 (8 万单位/支); 双蒸水,定溶至 1000mL ; 调整 pH 至 $7.6\text{--}7.8$ 。过滤除菌, $2\text{--}8^\circ\text{C}$ 保存。每个试剂盒 1 瓶, 25mL/瓶 。

[0148] 4) 洗涤液:为 20 倍的浓缩洗液,用前稀释。其配方为: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 58g , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.92g , NaCl 170g , Tween-20 5.0mL , Proclin 300 0.6mL , 用双蒸水定溶至 1000mL , 调整 pH 值至 $7.2\text{--}7.4$ 。每个试剂盒 1 瓶, 25mL/瓶 。

[0149] 5) 显色液 A:每个试剂盒 1 瓶, 7mL/瓶 。配方为:无水乙酸钠 4.5g , 冰醋酸 1.2mL , 过氧化脲 0.8g , 用双蒸水定溶至 1000mL 。

[0150] 6) 显色液 B:每个试剂盒 1 瓶, 7mL/瓶 。显色液 B 配方为:柠檬酸 1.62g , EDTA-2Na 0.372g , 甘油 100mL , 四甲基联苯胺盐酸盐 0.50g , 用双蒸水定溶至 1000mL 。

[0151] 8) 终止液:每个试剂盒 1 瓶, 7mL/瓶 。配方为: 1000mL 双蒸水中含有 98% 硫酸 27.8mL 。

[0152] 9) 标准口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒阳性血清:每个试剂盒 1 瓶, 1mL/瓶 。

[0153] 10) 标准口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒阴性血清:样品稀释液可作为阴性血清使用。

[0154] 实施例 4、用单克隆抗体 1F2anti 制备的金标纸层析测试卡检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒

[0155] 1、制备金标纸层析试纸

[0156] 如图 5、6 所示 (图中 5 为金标纸正面结构图,图中 6 为金标纸层析试纸的纵截面结构图),用于检测口蹄疫 O 型 (O/Mya98/BY/2010) 病毒的金标纸层析试纸由吸水垫 1、硝酸纤维素膜 (NC 膜) 2、玻璃纤维膜样品垫 3、玻璃纤维素膜结合物释放垫 4 组成,硝酸纤维素膜 2 上设有检测线 (T 线) 6 和质控线 (C 线) 5。

[0157] 金标纸层析试纸的制备方法包括以下步骤:

[0158] 1) 包被硝酸纤维素膜 (NC 膜) 2

[0159] 用浓度为 $1\text{--}5\text{mg/mL}$ 的单克隆抗体 1F2anti 包被检测线 (T 线)。用浓度为 $1\text{--}5\text{mg/}$

mL 的羊抗鼠免疫球蛋白（购自北京博尔西科技有限公司）包被质控线（C 线）。用 BIODOT 公司 XYZ3000 喷膜机将单克隆抗体 1F2anti 和羊抗鼠免疫球蛋白分别喷于 300mm 长、25mm 宽的硝酸纤维素膜（购自 Millipore 公司）2 上，形成相互分离的检测线 6 和质控线 5，质控线和测试线间距一般为 0.3-1.0cm，优选 0.5cm，37℃干燥 1 小时备用。

[0160] 2) 结合物释放垫 4 的制备

[0161] 2.1 用胶体金标记单克隆抗体 1F2anti，方法为：在磁力加热搅拌下，向三角瓶中加入 155mL 纯化水，煮沸。加入 1%四氯化金溶液 5mL，煮沸。再加入 1%柠檬酸三钠溶液 7mL，煮沸 5 分钟，即为胶体金溶液，冷却后保存于 2-8℃。取 1 毫升胶体金溶液于离心管中。加入 15 μ l 0.2M 碳酸钾溶液，室温静置 5min。加入 10 μ l 抗体，混匀后静置 30min。加入 10 μ l 20% BSA 溶液，平衡 5min。加入 10 μ l 20% PEG20000 溶液，平衡 30min；用离心机 10000rpm，离心 10min，去上清液。加入 100 μ l 金标复溶液（含有 2%蔗糖、1%酪蛋白、0.5% BSA、0.1Triton X100、0.1% SDS 的硼酸缓冲液），复溶后备用。

[0162] 2.2 制备结合物释放垫：结合物释放垫的材质为玻璃纤维膜，其上包被有胶体金标记的特异性单克隆抗体 1F2anti，将复溶后的金子用金标复溶液 1:4 稀释后按照 8 μ l/cm 的速度喷膜，37℃下放置 2 小时干燥，备用。

[0163] 3) 制备金标纸层析测试条和测试卡

[0164] 在 PVC 背板 7 上先黏贴硝酸纤维素膜 2，在靠近硝酸纤维素膜质控线的一端黏贴吸水垫 1，在靠近测试线一端黏贴结合物释放垫 4 和样品垫 3，得到用于检测口蹄疫 O 型（O/Mya98/BY/2010）病毒金标纸层析试纸，然后可按所需大小进行切割，得到用于检测口蹄疫 O 型（O/Mya98/BY/2010）病毒金标纸层析测试条，加干燥剂后密封保存。

[0165] 如将上述步骤制备的测试条装入塑料卡中，制成测试卡，并组装成试剂盒，该试剂盒对应于样品垫的部位设有点样口，对应于检测线和质控线的部位设有观测窗（图 7）。

[0166] 2、金标纸层析测试条和测试卡的使用

[0167] 金标纸层析试纸条的使用方法：将样品垫端浸入样品中，样品垫 3 即吸取液体向上端移动，流经结合物释放垫 4 时使干片上的胶体金标记单克隆抗体 1F2anti 复溶，并带动其向硝酸纤维素膜 2 渗移。若样本中有待测特异抗原（阳性样本），其可与胶体金标记单克隆抗体 1F2anti 结合，此抗原抗体复合物流至检测线 6 即被固相抗体所获，在膜上显出红色检测线条（T 线）。过剩的胶体金标记单克隆抗体 1F2anti 继续前行，至质控线 5 与羊抗鼠免疫球蛋白（固相二抗）结合，而显出红色质控线条（C 线）。反之，若样本中无待测特异抗原（阴性样本），则无检测线条（T 线），而仅显示质控线条（C 线）。如果检测线（T 线）与质控线（C 线）均不显色或仅检测线（T 线）显色，则表示金标纸层析试纸（卡）失效（图 5）。

[0168] 金标纸层析测试卡和试剂盒的使用方法：检测时，取待检样品 1-2 滴，滴在试纸盒的点样口，根据观测窗内的检测线（T 线）和质控线（C 线）是否出现色带来确定样品中是否存在口蹄疫 O 型（O/Mya98/BY/2010）病毒。

[0169] 3、用单克隆抗体 1F2anti 及金标纸层析试纸盒检测口蹄疫 O 型（O/Mya98/BY/2010）病毒

[0170] 用单克隆抗体 1F2anti 及金标纸层析试纸盒检测不同浓度（浓度分别为 500、250、125、62.5、31.3ng/mL）的口蹄疫 O 型（O/Mya98/BY/2010）病毒，以检测试纸盒的灵敏度。

[0171] 检测结果如图 7 所示,检测灵敏度可达 62.5ng/mL,表明该产品具有较好的灵敏度。

[0001]

<110> 北京三联博悦生物技术有限公司
金宇保灵生物药品有限公司

<120> 杂交瘤细胞株及其分泌的抗口蹄疫 O 型病毒的单克隆抗体与应用

<130> CGCNB155117W

<160> 4

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> 1F2anti 的重链可变区

<400> 1

Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Pro Cys

1 5 10 15

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys

20 25 30

Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Asn Pro Phe

35 40 45

Asn Gly Val Ala Ile Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu

50 55 60

Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu

65 70 75 80

Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Trp Asn Gln

85 90 95

Glu Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

[0002]

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

<213> 1F2anti 的轻链可变区

<400> 2

Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys

1 5 10 15

Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Ser

20 25 30

Asp Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu Ala Pro

35 40 45

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser

50 55 60

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Gly Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

65 70 75 80

Gln Gln Phe Thr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

85 90 95

Glu Ile

98

<210> 3

<211> 339

<212> DNA

<213> 1F2anti 的重链可变区的编码基因

<400> 3

tcaggacctg agctgggtgaa gcctggggct tcagtgaaga taccctgcaa ggcttctgga 60

tacacaetca ctgactacaa catggactgg gtgaagcaga gtcattggaaa gagccttgag 120

tggattggag atattaatcc tttcaatggt gttgetatet acaaccagaa tttcaaggac 180

[0003]

aaggccacat tgactgtaga caagtcctcc agcacagcct acatggagct ccgtagcctg	240
acatctgagg acaetgcagt ctattactgt gcaagattat ggaaccagga acgctatatt	300
gactactggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctca	339

<210> 4

<211> 294

<212> DNA

<213> 1F2anti 的轻链可变区的编码基因

<400> 4

ccagcaatca tgtctgcac tctaggggag aaggtcacca tgagctgcag ggccagctca	60
agtgtaaatt acatgttctg gtaccagcag aagtcagatg cctcccccaa actttggatt	120
tattacacat ccaatttggc tectggagtc ccagctcgct tcagtggcag tgggtctggg	180
aactcttatt ctctcacaat cagcagcatg gagggatgaag atgctgccac ttattactgc	240
cagcagttaa ctagttaacc gtggacgttc ggtggaggga ccaagctgga gatc	294

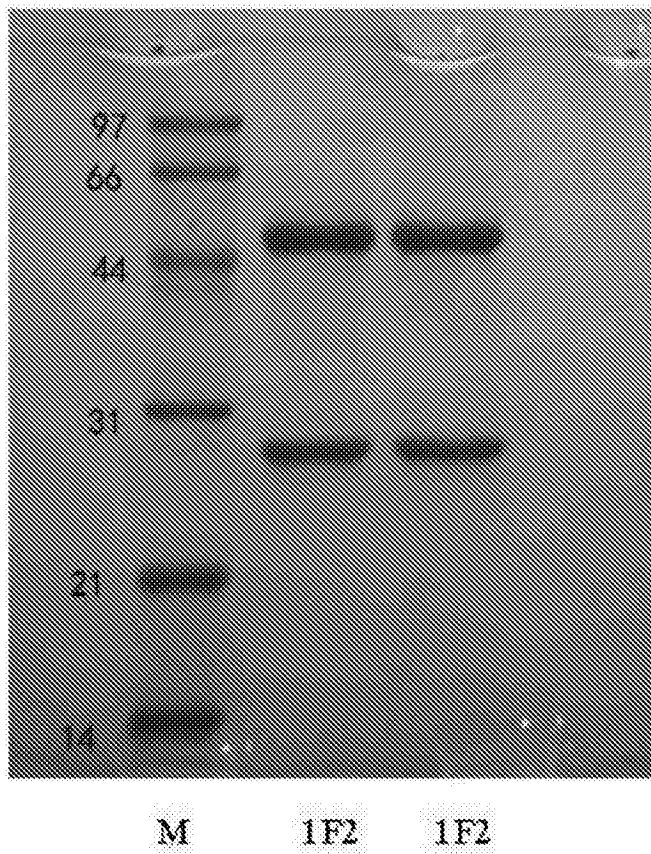


图 1

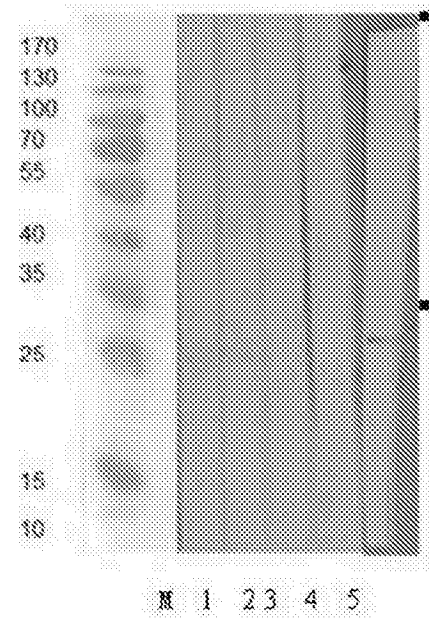


图 2

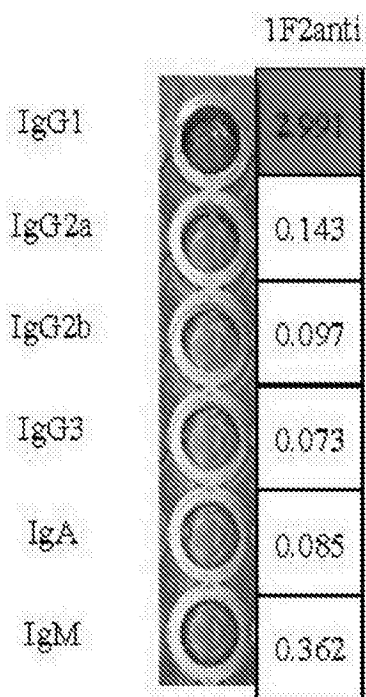


图 3

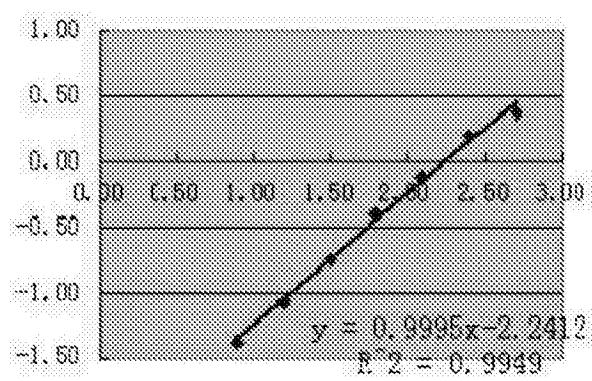


图 4

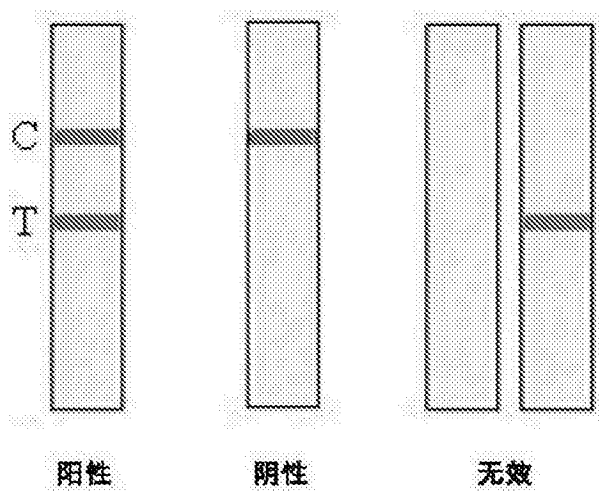


图 5

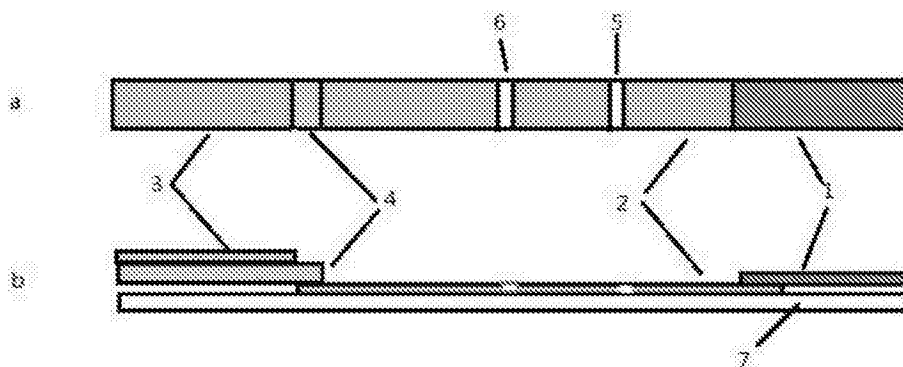


图 6

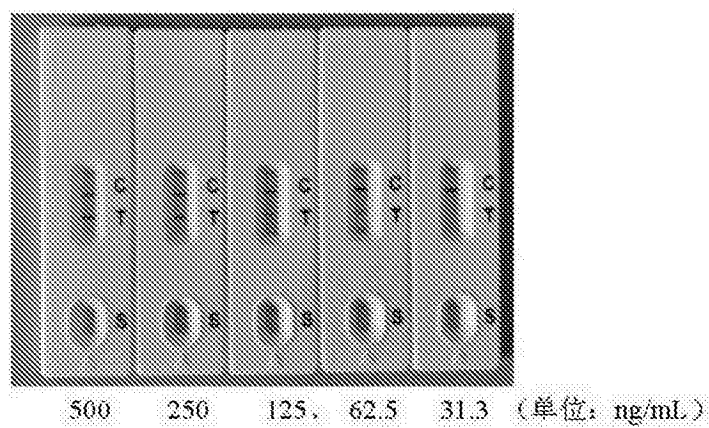


图 7

专利名称(译)	杂交瘤细胞株及其分泌的抗口蹄疫O型病毒的单克隆抗体与应用		
公开(公告)号	CN105296434A	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201510737022.0	申请日	2015-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京三联博悦生物技术有限公司 金宇保灵生物药品有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京三联博悦生物技术有限公司 金宇保灵生物药品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京三联博悦生物技术有限公司 金宇保灵生物药品有限公司		
[标]发明人	郑金来 张翀宇 吴园园 刘国英 任旭荣 李蓉 范秀丽 郝金宝 苍枫 刘飞		
发明人	郑金来 张翀宇 吴园园 刘国英 任旭荣 李蓉 范秀丽 郝金宝 苍枫 刘飞		
IPC分类号	C12N5/20 C12N15/13 C07K16/10 G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/535 C12R1/91		
代理人(译)	鲁兵		
其他公开文献	CN105296434B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明杂交瘤细胞株及其分泌的抗口蹄疫O型病毒的单克隆抗体与应用，使用可以诱发机体产生免疫反应的口蹄疫O型(O/Mya98/BY/2010)病毒作为免疫原得到能持续、稳定分泌抗口蹄疫O型(O/Mya98/BY/2010)病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞株1F2，并由该细胞株分泌得到单克隆抗体1F2anti。该单克隆抗体能够特异性地识别口蹄疫O型(O/Mya98/BY/2010)病毒，可用于检测口蹄疫O型(O/Mya98/BY/2010)病毒，并具有高特异性、高灵敏度的优点，可应用在口蹄疫O型(O/Mya98/BY/2010)病毒的检测、疫苗生产、流行病学研究中。

	细胞株 1F2	细胞株 2B4	细胞株 5C3	细胞株 4H9	细胞株 7F5
细胞培养 上清效价	1:60	1:8	1:64	1:120	1:100