

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610154759.0

[51] Int. Cl.

C12N 5/18 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 9 月 26 日

[11] 公开号 CN 101041817A

[22] 申请日 2006.11.24

[21] 申请号 200610154759.0

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号

[72] 发明人 鲁兴萌 朱宏杰 张 凡 陈正贤
陆奇能

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司
代理人 唐银益

权利要求书 2 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

一种杂交瘤、单克隆抗体及其制备方法与用途

[57] 摘要

本发明公开了一种杂交瘤，杂交瘤细胞 BmIFV-4E12 CCTCC NO: C200630；本发明还公开了一种单克隆抗体及其制备方法和用途，该抗体是由杂交瘤细胞 BmIFV-4E12 CCTCC NO: C200630 分泌的单克隆抗体；从感染家蚕软化病症的家蚕中肠细胞分离纯化家蚕病毒性软化病毒作为免疫原，利用单克隆抗体技术制备获得一株家蚕病毒性软化病毒特异的单克隆抗体；该抗体被用于诊断家蚕病毒性软化病毒。本发明的单克隆抗体可直接用于诊断家蚕病毒性软化病毒，适合对家蚕病毒病的早期诊断，通过小白鼠腹腔注射单抗细胞株，即可获得大量的单克隆抗体，与多克隆抗体相比，具有纯度高，专一性强、重复性好等优点。

1、一种杂交瘤，其特征在于：该杂交瘤为杂交瘤细胞 BmIFV-4E12 CCTCC NO:C200630。

2、一种单克隆抗体，其特征在于：该抗体是由杂交瘤细胞 BmIFV-4E12 CCTCC NO:C200630 分泌的单克隆抗体。

3、一种如权利要求 2 所述单克隆抗体的制备方法，其特征在于：该抗体从感染家蚕软化病症的家蚕中肠细胞分离纯化家蚕病毒性软化病毒作为免疫原，利用单克隆抗体技术制备获得一株家蚕病毒性软化病毒特异的单克隆抗体。

4、根据权利要求 3 所述的单克隆抗体的制备方法，其特征依次包括以下步骤：

(1) 采用蔗糖密度梯度超速离心法，用电镜检测，从感染家蚕软化病症的中肠组织中分离纯化家蚕病毒性软化病毒；

(2) 用蛋白量为 200 μ g 纯化的完整的家蚕病毒性软化病毒粒子腹腔注射小白鼠，用福氏完全佐剂；经 15 天后进行二次相同剂量免疫，用福氏不完全佐剂；再 15 天后进行三次免疫，用加倍剂量的纯病毒不加佐剂；3 天后取脾细胞进行融合；

(3) 将免疫小白鼠脾细胞与小白鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 按 5-10: 1 的比例，在无血清的 RPMI-1640 培养基中混匀，1500rpm 离心 5min，去除培养基，用 50%PEG 作为融合剂，在 37 $^{\circ}$ C 下加入 0.5-0.7ml，融合 2min，用无血清的 RPMI-1640 培养基终止融合后，1500rpm 离心 5min，沉淀用 HAT 培养基悬浮，分装到 96 孔含有饲养细胞的细胞板中，37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 的细胞培养箱中培养；细胞培养箱中培养 5 天后，用 HAT 培养基换液一次，第 10 天用 HT 培养基换液，等到融合细胞覆盖孔底 10%-50%时，常规间接 ELISA 方法筛选阳性孔；

(4) 筛选出的特异性强阳性孔用常规的有限稀释法克隆，获得单抗细胞株 BmIFV-4E12；细胞株 BmIFV-4E12 进一步扩大培养，用于制备单抗腹水和液氮冻存；

(5) 取 8 周龄左右 BALB/C 小鼠，腹腔注射 0.3-0.5ml 降植烷，7-10 天后腹腔注入 5-10 $\times 10^5$ 个杂交瘤细胞，注射后 7-10 天可见小鼠腹部明显膨大，采取腹水，2000rpm 离心 3min，收集上清液，即为单克隆抗体腹水；辛酸-硫酸铵

盐析法纯化单克隆抗体，-70℃保存；4E12 细胞株制备得单克隆抗体，即为可专一识别家蚕病毒性软化病毒的抗体。

5、一种如权利要求 2 所述的单克隆抗体的用途，其特征在于：它被用于诊断家蚕病毒性软化病毒。

一种杂交瘤、单克隆抗体及其制备方法与用途

技术领域

本发明属于微生物领域，特别涉及一种能识别家蚕病毒性软化病毒的单克隆抗体。

背景技术

1960 年日本学者山崎等从大量发生软化病的长野县农家收集病蚕，并通过添食试验认为是病毒引起的病毒性软化病，其后 Ayuzawa (1964) 和 Watanabe (1976) 等的研究确认该病害的病因是病毒所引起的疾病，称为家蚕病毒性软化病，或称家蚕传染性软化病。

1958 年在我国的蚕茧主产区江浙一带大量发生食桑渐次减少，行动迟缓，体躯瘦削，渐至完全停止取食，肠腔前端无桑叶，消化液变成红褐色，胸部呈半透明状的空头性软化病蚕。1959 年造成早秋蚕 85% 的损失，由此提出该病可能为病毒性的蚕病，此后用病蚕中肠的磨碎液经 Berkefeld 等细菌过滤器过滤以后，进行蚁蚕添食的生物试验重演相同病征等事实，确认在我国养蚕生产中存在着由非包涵体病毒引起的传染性蚕病。在日本首先发现病毒性软化病病毒后，我国的许多文献资料都将出现类似病征的情况称之为家蚕病毒性软化病，而当时发现的非包含体病蚕材料在后来的研究中相继被鉴定为浓核病病毒 (Bombyx mori Densonuclearsis Virus, BmDNV)。

养蚕生产上，病征是肉眼诊断病害的主要依据，家蚕病毒性软化病病蚕的主要症状是“空头”和“起缩”，根据病征进行肉眼诊断已有很长的历史。食桑减少，发育不良，眠起不齐；在群体中比健康个体更为瘦小，体色灰黄不见转青，体壁多皱，或排念珠状蚕粪，或下痢并带有黄褐色，或吐液等症状；在盛食期还有体色失去原有青白色，胸部稍膨大，半透明略带暗红，渐次全身呈半透明。死亡前吐液，死后尸体软化。严重发病时，蚕座及蚕室有异常的臭气等等都是家蚕病毒性软化病病蚕中经常出现的病征。但 BmDNV 和细菌等病原微生物引起的家蚕病害也会出现与这些病征类似的症状，因此该病也是用肉眼诊断法难于诊断的病害。生物感染试验可以判断出是否是非包含体病毒所引起，但无法区

别是 BmDNV 还是 BmFV 所引起。普通的光学显微镜方法可以通过检查中肠消化液作出判断, 如有大量细菌或 BmCPV 可能不是 BmFV 引起, 如未见两者可能是非包含体病毒所引起, 但也无法区别是 BmDNV 还是 BmFV 所引起。琼脂糖双扩散法等血清学方法是较为简易实施和作出初步判断的方法, 也存在无法区别是 BmDNV 还是 BmFV 的缺陷。应用 PCR 检测的方法, 可精确地检测 BmFV, 但费用昂贵, 在广大蚕农中难以推广。

发明内容

本发明的一种杂交瘤细胞 BmIFV-4E12, 已于 2006 年 6 月 26 日保藏于中国典型培养物保藏中心(简称: CCTCC)(中国武汉市武汉大学), 保藏号: CCTCC NO:C200630。

一种单克隆抗体, 该抗体是由杂交瘤细胞 BmIFV-4E12 CCTCC NO:C200630 分泌的单克隆抗体。

单克隆抗体的制备方法: 该抗体从感染家蚕软化病症的家蚕中肠细胞分离纯化家蚕病毒性软化病毒作为免疫原, 利用单克隆抗体技术制备获得一株家蚕病毒性软化病毒特异的单克隆抗体。

单克隆抗体的制备方法, 具体包括以下步骤:

(1) 采用蔗糖密度梯度超速离心法, 用电镜检测, 从感染家蚕软化病症的中肠组织中分离纯化家蚕病毒性软化病毒;

(2) 用蛋白量为 200 μ g 纯化的完整的家蚕病毒性软化病毒粒子腹腔注射小白鼠, 用福氏完全佐剂; 经 15 天后进行二次相同剂量免疫, 用福氏不完全佐剂; 再 15 天后进行三次免疫, 用加倍剂量的纯病毒不加佐剂; 3 天后取脾细胞进行融合;

(3) 将免疫小白鼠脾细胞与小白鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)按 5-10: 1 的比例, 在无血清的 RPMI-1640 培养基中混匀, 1500rpm 离心 5min, 去除培养基, 用 50%PEG 作为融合剂, 在 37 $^{\circ}$ C 下加入 0.5-0.7ml, 融合 2min, 用无血清的 RPMI-1640 培养基终止融合后, 1500rpm 离心 5min, 沉淀用 HAT 培养基悬浮, 分装到 96 孔含有饲养细胞的细胞板中, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。细胞培养箱中培养 5 天后, 用 HAT 培养基换液一次, 第 10 天用 HT 培养基换液, 等到融合细胞覆盖孔底 10%-50%时, 常规间接 ELISA 方法筛选阳性孔。

(4) 筛选出的特异性强阳性孔用常规的有限稀释法克隆, 获得单抗细胞株 BmIFV-4E12。细胞株 BmIFV-4E12 进一步扩大培养, 用于制备单抗腹水和液氮冻

存。

(5) 取8周龄左右BALB/C小鼠，腹腔注射0.3-0.5ml 降植烷，7-10天后腹腔注入 $5-10 \times 10^5$ 个杂交瘤细胞，注射后7-10天可见小鼠腹部明显膨大，采取腹水，2000rpm离心3min，收集上清液，即为单克隆抗体腹水。辛酸-硫酸铵盐析法纯化单克隆抗体，-70℃保存。4E12细胞株制备得单克隆抗体，即为可专一识别家蚕病毒性软化病毒的抗体。

单克隆抗体的用途，它被用于诊断家蚕病毒性软化病毒。

本发明的单克隆抗体可直接用于诊断家蚕病毒性软化病毒，适合对家蚕病毒病的早期诊断，通过小白鼠腹腔注射单抗细胞株，即可获得大量的单克隆抗体，与多克隆抗体相比，具有纯度高，专一性强、重复性好等优点。

具体实施方式

单克隆抗体的制备方法为：首先从感染家蚕软化病症的家蚕中肠细胞分离纯化家蚕病毒性软化病毒，将该病毒为免疫原，利用单克隆抗体技术制备获得一株家蚕病毒性软化病毒特异的单克隆抗体。

以下结合具体实施例进一步说明。

实施例1：单克隆抗体的制备

1、采用蔗糖密度梯度超速离心法，用电镜检测，从感染家蚕软化病症的中肠组织中分离纯化家蚕病毒性软化病毒。

2、用蛋白量为200μg 纯化的完整的家蚕病毒性软化病毒粒子腹腔注射小白鼠，用福氏完全佐剂；经15天后进行二次免疫，用福氏不完全佐剂；再15天后进行三次免疫，加倍剂量的纯病毒不加佐剂；3天后取脾细胞进行融合。

3、取免疫小白鼠脾细胞与小白鼠骨髓瘤细胞（SP2/0）按8：1的比例，在无血清的RPMI-1640培养基中混匀，1500rpm离心5min，去除培养基，用50%PEG作为融合剂，在37℃下加入0.6ml，融合2min，用无血清的RPMI-1640培养基终止融合后，1500rpm离心5min，沉淀用HAT培养基悬浮，分装到96孔含有饲养细胞的细胞板中，37℃，5%CO₂的细胞培养箱中培养。细胞培养箱中培养5天后，用HAT培养基换液一次，第10天用HT培养基换液，等到融合细胞覆盖孔底10%-50%时，常规间接ELISA方法筛选阳性孔。

4、筛选出的特异性强阳性孔用常规的有限稀释法克隆，获得单抗细胞株：

杂交瘤细胞BmIFV-4E12。细胞株进一步扩大培养，用于制备单抗腹水和液氮冻存。

5、取8周龄左右BALB/C小鼠，腹腔注射0.4ml降植烷，8天后腹腔注入 8×10^5 个杂交瘤细胞BmIFV-4E12，注射后9天可见小鼠腹部明显膨大，采取腹水，2000rpm离心3min，收集上清液，即为单克隆抗体腹水。辛酸-硫酸铵盐析法纯化单克隆抗体， -70°C 保存。单抗细胞株制备得单克隆抗体，即为可专一识别家蚕病毒性软化病毒的抗体。

实施例2：该单克隆抗体在家蚕病毒性软化病毒的诊断的应用

- 1、将5ul待测样品病蚕中肠磨碎上清液点于硝酸纤维素膜上。
- 2、将膜放于10ml 15%的脱脂奶粉中，于室温放置1分钟。
- 3、用PBS将膜洗3次，每次3min。
- 4、将膜与3ml用PBS稀释5000倍的单克隆抗体，在室温下保温10分钟。
- 5、重复步骤3。
- 6、将膜与3ml用PBS稀释8000倍稀释的酶标羊抗鼠IgG/辣根过氧化物酶在室温下保温10分钟。
- 7、重复步骤3。
- 8、2mg二氨基联苯胺，10ul H_2O_2 加入到10ml 50mmol/L三羟甲基氨基甲烷一盐酸， $\text{pH}7.6$ 中，制成底物溶液，再将膜放入底物溶液中，反应10分钟，有褐色斑点即为病毒阳性。

实施例3：该单克隆抗体的琼脂糖双扩散试验

称取琼脂糖1g加入50ml蒸馏水中，于沸水浴中加热溶解，然后加入0.05mol/L巴比妥缓冲液（ $\text{pH}=8.6$ ）50ml，配制成1%的琼脂，分装备用。将融化的1%琼脂冷至 50°C 左右，量取4ml，倒在 $7.5\text{cm} \times 2.5\text{cm}$ 预先洗净、干燥、水平放置的载玻片。待凝固后，用孔径3mm-4mm的打孔器按梅花状打孔。孔距为4mm，再用注射器针头或镊子挑去孔内琼脂。在梅花孔的中央孔中滴加单抗，四周孔中滴加家蚕样本上清及健康对照。将琼脂平板放入带盖的玻璃皿中，下面垫3-4层湿纱布，保持一定的湿度，并将玻璃皿放在 37°C 恒温箱中，18h-20h取出观察结果。如在中央孔与四周某一样品孔之间出现乳白色新月形沉淀带，则说明该样品有IFV病毒的存在（病毒阳性）。如未见乳白色新月形沉淀带，可将载玻片

(及上载琼脂糖等)放入含有0.85%的NaCl溶液中浸泡8h,再次观察是否有乳白色新月形沉淀带,如有乳白色新月形沉淀带则说明该样品有IFV病毒的存在(病毒阳性);如没有说明该样品没有IFV病毒的存在(病毒阴性)。

实施例4:该单克隆抗体腹水效价测定

间接ELISA方法检测单抗腹水效价。将1mg/ml提纯病毒抗原用包被液稀释,100 μ l/孔包被ELISA板,4℃过夜,使其吸附于聚苯乙烯板孔;PBST洗涤三次后用5%的脱脂奶粉封闭30 min;将单克隆抗体腹水作倍比稀释加入包被孔100 μ l/孔,37℃ 1h;PBST洗涤三次后加入按说明书稀释10000倍的辣根过氧化物酶标记兔抗鼠IgG二抗(Sigma公司)100 μ l/孔,37℃ 1h,PBST洗涤四次后,用OPD-H2O2底物显色,2 mol/L H_2SO_4 终止反应后,用酶标仪读取OD₄₉₀的值,以与阴性OD值比值大于2.1为阳性测定单抗腹水效价。

注射单克隆杂交瘤细胞的BALB/C小鼠,约7d-10d后腹部膨大,采集腹水,以后每天取一次,每只小鼠可取10ml-20ml腹水。用辛酸-硫酸铵方法纯化的单克隆抗体腹水蛋白质浓度为:4E12, 2.252 mg/ml。

单克隆抗体腹水的间接ELISA效价达 10^{-6} 以上。

实施例5:该单克隆抗体类型及亚类鉴定

将单抗腹水与Sigma公司的标准抗BALB/C小鼠IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM抗体,作双向琼脂扩散试验以鉴定抗体类型。

琼扩试验步骤如下:称取琼脂糖1g加入50 ml蒸馏水中,于沸水浴中加热溶解,然后加入0.05 mol/L巴比妥缓冲液(pH=8.6) 50 ml,配制成1%的琼脂,分装备用。将融化的1%琼脂冷至50℃左右,量取4 ml,倒在7.5cm×2.5cm预先洗净、干燥、水平放置的载玻片。待凝固后,用孔径3 mm-4 mm的打孔器按梅花状打孔。孔距为4 mm,再用注射器针头或镊子挑去孔内琼脂。在梅花孔的中央孔中滴加适当稀释的单抗腹水,四周孔中分别滴加标准抗BALB/C小鼠IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM抗体。将琼脂平板放入带盖的玻璃皿中,下面垫3-4层湿纱布,保持一定的湿度,并将玻璃皿放在37℃恒温箱中,18 h-20 h取出观察沉淀线,判断单抗的抗体类型及亚类。抗体类型及亚类鉴定结果表明,4E12的抗体类型及亚类为IgG1。

实施例6:该单抗的特异性反应试验

与感染家蚕的浓核病毒 (BmDNV) 特异性反应采用三抗体夹心ELISA (TAS-ELISA) 方法, 测定4E12, 3G3两株单抗腹水与提纯病毒 (BmDNV) 的特异性反应, 以免疫抗原作阳性对照, 以相应的健蚕中肠组织磨碎液作阴性对照。

TAS-ELISA实验步骤:

- (1) BmFV兔抗血清IgG1, 5000倍稀释, 包被ELISA板, 37℃, 2h。
- (2) 用含5% BSA的PBST封闭液封闭, 37℃, 30min。
- (3) 加入用PBST稀释的提纯病毒 (BmFV) 及阳性、阴性对照。
- (4) 用PBST洗三次, 每次3min。
- (5) 加入用PBST稀释5000倍的单抗腹水, 37℃, 1h。
- (6) 重复(4)。
- (7) 加入3000倍稀释的酶标羊抗鼠IgG结合物, 37℃, 1h.。
- (8) 重复(4)。
- (9) 加底物溶液, 37℃, 15min。加2 mol/L的H₂SO₄ 50 mL终止反应, 测OD_{490nm}值, 以P/N>2.1为阳性判断标准。

TAS-ELISA测定表明, 单抗4E12仅对BmFV有特异性反应, 而与BmDNV无特异性反应, 说明用这单抗建立的TAS-ELISA方法对BmFV有很好的特异性 (表1)。

表 1:单克隆抗体的特异性鉴定

Virus	MAbs
	4E12
BmFV	1.423
BmDNV	0.024
Health control	0.026

最后, 还需要注意的是, 以上列举的仅是本发明的具体实施例子。显然, 本发明不限于以上实施例子, 还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形, 均应认为是本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种杂交瘤、单克隆抗体及其制备方法与用途		
公开(公告)号	CN101041817A	公开(公告)日	2007-09-26
申请号	CN200610154759.0	申请日	2006-11-24
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	鲁兴萌 朱宏杰 张凡 陈正贤 陆奇能		
发明人	鲁兴萌 朱宏杰 张凡 陈正贤 陆奇能		
IPC分类号	C12N5/18 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/569		
其他公开文献	CN100554416C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种杂交瘤，杂交瘤细胞BmIFV - 4E12 CCTCC NO：C200630；本发明还公开了一种单克隆抗体及其制备方法和用途，该抗体是由杂交瘤细胞BmIFV - 4E12 CCTCC NO：C200630分泌的单克隆抗体；从感染家蚕软化病症的家蚕中肠细胞分离纯化家蚕病毒性软化病毒作为免疫原，利用单克隆抗体技术制备获得一株家蚕病毒性软化病毒特异的单克隆抗体；该抗体被用于诊断家蚕病毒性软化病毒。本发明的单克隆抗体可直接用于诊断家蚕病毒性软化病毒，适合对家蚕病毒病的早期诊断，通过小白鼠腹腔注射单抗细胞株，即可获得大量的单克隆抗体，与多克隆抗体相比，具有纯度高，专一性强、重复性好等优点。