



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105296435 B

(45)授权公告日 2019.03.12

(21)申请号 201510753950.6

(22)申请日 2015.11.06

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105296435 A

(43)申请公布日 2016.02.03

(83)生物保藏信息
CGMCC NO.11196 2015.09.16
CGMCC NO.11195 2015.09.16

(73)专利权人 金宇保灵生物药品有限公司
地址 010030 内蒙古自治区呼和浩特市鄂
尔多斯西街58号

专利权人 北京标驰泽惠生物科技有限公司

(72)发明人 刘国英 郑金来 范秀丽 吴园园
任旭荣 李蓉 张燕红 郝金宝
魏学峰 商晓桂

(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.
G12N 5/20(2006.01)
C07K 16/10(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/558(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/535(2006.01)
C12R 1/91(2006.01)

(56)对比文件
CN 1900115 A,2007.01.24,

审查员 温婧

权利要求书1页 说明书16页
序列表5页 附图4页

(54)发明名称

杂交瘤细胞株及其分泌的抗口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒的特异性单克隆抗体与应用

(57)摘要

本发明公开了能持续、稳定分泌抗口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株6D6,以及由其分泌得到的特异性单克隆抗体6D6anti。6D6anti能够特异性地识别口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒,在ELISA检测中以6D6anti作为包被及酶标抗体可用于检测口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒,并具有高特异性、高灵敏度的优点。本发明将在口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒的检测、疫苗生产、流行病学研究中发挥重要作用。

1. 以口蹄疫0型0/GX/09-7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0/GX/09-7病毒的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 名称为6D6, 其保藏编号为CGMCC No.11196。

2. 由权利要求1所述杂交瘤细胞株6D6分泌的特异性单克隆抗体6D6anti, 其重链可变区氨基酸残基序列由序列表中SEQ ID No:1表示, 轻链可变区氨基酸残基序列由序列表中SEQ ID No:2表示。

3. 根据权利要求2所述的单克隆抗体, 其特征在于: 编码单克隆抗体6D6anti的基因, 其重链可变区编码基因的DNA序列由序列表中SEQ ID No:3表示, 其轻链可变区编码基因的DNA序列由序列表中SEQ ID No:4表示。

4. 一种检测口蹄疫0型0/GX/09-7病毒的ELISA试剂盒, 包括权利要求2或3所述口蹄疫0型0/GX/09-7病毒的特异性单克隆抗体6D6anti。

5. 根据权利要求4所述的ELISA试剂盒, 其特征在于, 包括: 用口蹄疫0型0/GX/09-7病毒的特异性单克隆抗体6D6anti作为包被抗体包被的微孔板, 和用6D6anti作为酶标抗体的酶标记抗体工作液。

6. 根据权利要求5所述的ELISA试剂盒, 其特征在于, 所述用6D6anti作为包被抗体包被的微孔板指的是用10mM pH7.0-7.4PBS将6D6anti稀释成0.5-10 μ g/mL, 加入微孔板中, 110 μ l/孔, 置于2-8 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C过夜; 拍干、干燥后真空装入铝箔袋中备用;

所述酶标抗体为用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶标记酶标记抗体, 然后用酶标记抗体稀释液稀释成工作液, 工作液的浓度为0.1-1.0 μ g/mL; 所述酶标记抗体稀释液配方为: 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。

7. 权利要求5或6所述ELISA试剂盒的使用方法, 用于对口蹄疫0型0/GX/09-7病毒的非诊断性检测, 包括以下步骤:

- 1) 用单克隆抗体6D6anti包被微孔板, 洗板;
- 2) 封闭经包被的酶联板, 洗板;
- 3) 加待测样品, 洗板; 所述样品为疫苗;
- 4) 加辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶标记的单克隆抗体6D6anti, 洗板;
- 5) 加底物显色;
- 6) 终止反应;
- 7) 测定OD₄₅₀值。

8. 一种检测口蹄疫0型0/GX/09-7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、硝酸纤维素膜组成, 硝酸纤维素膜上设有检测线和质控线, 其特征在于:

用浓度为1-5mg/mL的权利要求2所述单克隆抗体6D6anti包被检测线, 用浓度为1-5mg/mL的羊抗鼠免疫球蛋白包被质控线;

结合物释放垫上包被有胶体金标记的特异性单克隆抗体6D6anti。

杂交瘤细胞株及其分泌的抗口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的特异性单克隆抗体与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及杂交瘤细胞株及其分泌的单克隆抗体,特别涉及口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的特异性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/GX/09-7)病毒中的应用。

背景技术

[0002] 口蹄疫(Foot-and-mouth Disease,FMD)属一类传染病,俗名“口疮”、“辟癩”,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,其临床特征为口腔粘膜、蹄部和乳房皮肤发生水疱。口蹄疫病毒主要侵害偶蹄兽,偶见于人和其它动物,其主要宿主包括猪、牛、羊等主要家畜和其它家养、野生偶蹄动物等,易感动物多达70多种,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。口蹄疫传播途径多、速度快,曾多次在世界范围内暴发流行,造成巨大政治、经济损失。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。鉴于此,世界动物卫生组织(法语:Office international des épizooties,OIE,也称“国际兽疫局OIE)将其列为A类传染病之首。目前,有三分之二的OIE成员国流行口蹄疫,时刻威胁着无口蹄疫国家和地区的家畜安全和畜产品贸易。

[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] 口蹄疫病毒(FMDV)是偶蹄类动物高度传染性疾病(口蹄疫)的病原,属于微核糖核酸(小RNA)病毒科(Picornaviridae)口蹄疫病毒属(Aphthovirus),其最大颗粒直径为23纳米,最小颗粒直径为7-8纳米,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。

[0005] 目前,口蹄疫病毒在全世界主要有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,以及65个以上亚型。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。O型口蹄疫为全世界流行最广的一个血清型,我国流行的口蹄疫主要为O、A、C三型及ZB型(云南保山型)。口蹄疫O型包含多种毒株:O/GX/09-7、O/Mya98/XJ/2010、O/Mya98/BY/2010、O/JMS/2000等。其中,口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒是由中国兽医药品监察所提供,属于Cathay拓扑型新猪毒,该毒株对乳鼠的适应性较好,毒力较强;在BHK-21细胞上适应性好,遗传稳定;对猪毒力较强;毒株具有较广的抗原谱;1毫升抗原表达量可达3微克以上,每毫升TCID₅₀可达10^{7.5}以上。

[0006] 目前,口蹄疫灭活疫苗是预防该病发生的主要有效手段,主要通过将口蹄疫病毒

体外培养后、灭活,然后与乳化剂混合制成免疫疫苗。

[0007] FMDV的免疫是依赖T细胞的B细胞应答,疫苗接种主要诱导中和抗体的产生。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,但是无法对多价疫苗的某种毒株进行单独定量。

[0008] 目前,对口蹄疫的检测和诊断,主要基于临床判断以及PCR分子检测。PCR是一个高灵敏的方法,但特异性存在不足,对口蹄疫的确诊还需要配合核酸测序。因此,这个方法成本高、操作复杂、对人员的要求也高。

[0009] 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,比如中国农业科学院兰州兽医研究所开发、生产的O型口蹄疫146S抗原定量ELISA检测试剂盒,已提交专利申请(CN103076451A),该试剂盒采用了O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O型的不同毒株,比如新疆株(O/Mya98/XJ/2010株)和广西株(O/GX/09-7株),因而就无法对多组份O型疫苗中的每种O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可能会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。

[0010] 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,但尚不足以应用到口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的检测,可特异性检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的单克隆抗体仍是研究方向。

发明内容

[0011] 本发明的第一个目的是提供用于检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的杂交瘤细胞株及其产生的特异性单克隆抗体。

[0012] 本发明所提供的以口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒为免疫原免疫小鼠获得的持续、稳定分泌抗口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株,名称为6D6,该细胞株已于2015年9月16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.11196。

[0013] 由杂交瘤细胞株6D6分泌的特异性单克隆抗体命名为6D6anti,来源于小鼠属小鼠(*Mus musculus*),也属于本发明。

[0014] 6D6anti的重链可变区具有列表中的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/GX/09-7) 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/GX/09-7) 病毒特异结合的多肽。

[0015] 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99个氨基酸残基组成。

[0016] 编码单克隆抗体6D6anti的基因 (6D6anti),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;

[0017] 所述高严谨条件为在 $0.1 \times$ SSPE (或 $0.1 \times$ SSC)、 0.1% SDS的溶液中, 65°C 条件下杂交并洗膜。

[0018] 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297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。

[0019] 含有本发明基因6D6anti的表达载体、转基因细胞系或宿主菌均属于本发明。

[0020] 获得本发明的杂交瘤细胞株6D6的方法,可包括以下步骤:

[0021] 1) 用口蹄疫0型 (0/GX/09-7) 病毒作为免疫原免疫动物;

[0022] 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;

[0023] 3) 筛选杂交瘤细胞,得到杂交瘤细胞株6D6。

[0024] 获得特异性单克隆抗体6D6anti的方法,是在上述步骤的基础上增加以下步骤:

[0025] 4) 从杂交瘤细胞株6D6的培养液或接种杂交瘤细胞株6D6的动物的腹水液中分离并纯化出单克隆抗体。

[0026] 在上述方法中,步骤1) 中的口蹄疫0型 (0/GX/09-7) 病毒可为活病毒或灭活病毒,优选为灭活病毒,浓度为 $10-1000\mu\text{g}/\text{mL}$;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。

[0027] 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。

[0028] 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。

[0029] 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/GX/09-7) 病毒单克隆抗体6D6anti的杂交瘤细胞株6D6,并从细胞培养液或小鼠腹水液中收集和纯化出特异性单克隆抗体6D6anti。

[0030] 本发明还提供特异性单克隆抗体6D6anti在口蹄疫0型 (0/GX/09-7) 病毒的ELISA检测中的应用,是用口蹄疫0型 (0/GX/09-7) 病毒的特异性单克隆抗体6D6anti作为包被抗体和酶标抗体的双抗夹心ELISA检测方法,可包括以下步骤:

[0031] 1) 用特异性单克隆抗体6D6anti包被酶联板,洗板;

- [0032] 2) 封闭经包被的微孔板,洗板;
- [0033] 3) 加待测样品,洗板;
- [0034] 4) 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6D6anti,洗板;
- [0035] 5) 加底物显色;
- [0036] 6) 终止反应;
- [0037] 7) 测定OD₄₅₀值。
- [0038] 本发明另一目的是提供一种检测口蹄疫0型 (O/GX/09-7) 病毒的ELISA试剂盒。
- [0039] 本发明所提供的检测口蹄疫0型 (O/GX/09-7) 病毒的ELISA试剂盒,包括用6D6anti作为包被抗体包被的微孔板和用6D6anti作为酶标抗体的酶标记抗体工作液。
- [0040] 所述用6D6anti作为包被抗体包被的微孔板指的是用10mM pH7.0-7.4 PBS 将6D6anti稀释成0.5-10 μ g/mL,加入微孔板中,110 μ l/孔,置于2-8 $^{\circ}$ C过夜。拍干后,加入含1% BSA的10mM pH7.0-7.4 PBS,300 μ l/孔。置于2-8 $^{\circ}$ 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: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) 稀释成工作液,工作液的浓度为0.1-1.0 μ 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H₂SO₄溶液。
- [0043] 此外,为方便检测,所述试剂盒还可包括:稀释液,如pH 7.0-7.4 10mM 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0型 (O/GX/09-7) 病毒阳性血清(阳性对照)和标准口蹄疫0型 (O/GX/09-7) 病毒阴性血清(阴性对照),可用稀释液作为阴性对照使用。
- [0045] 本发明再一目的是提供一种检测口蹄疫0型 (O/GX/09-7) 病毒的金标纸层析试纸。
- [0046] 用于检测口蹄疫0型 (O/GX/09-7) 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2H10anti或6D6anti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),具体操作:用BIODOT公司XYZ3000喷膜机将单克隆抗体2H10anti或6D6anti、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 $^{\circ}$ 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6D6anti,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℃。取1毫升胶体金溶液于离心管中。加入15μl 0.2M碳酸钾溶液,室温静置5min。加入10μl抗体,混匀后静置30min。加入 10μl 20%BSA溶液,平衡5min。加入10μl 20%PEG20000溶液,平衡30min;用离心机10000rpm,离心10min,去上清液。加入100μl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。

[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6D6anti,将复溶后的金子1:4稀释后按照8μl/cm的速度喷膜,37℃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0型(O/GX/09-7)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0型(O/GX/09-7)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0型(O/GX/09-7)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0型(O/GX/09-7)病毒的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株6D6,以及由细胞株6D6分泌得到的特异性单克隆抗体6D6anti。本发明的单克隆抗体6D6anti能够特异性地识别口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒,与口蹄疫0型(O/Mya98/XJ/2010)、口蹄疫0型(O/Mya98/BY/2010)、口蹄疫0型(O/JMS/2000)、亚洲1型(JSL/06)和A型(Re-A/WH/09)病原体无交叉反应,因此,以6D6anti作为包被抗体可用于检测口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒,并具有高特异性、高灵敏度的优点。实验证明,本发明的特异性单克隆抗体可以准确检测样品中口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒的水平,而不与口蹄疫0型(O/Mya98/BY/2010)、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0型(O/GX/09-7)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0型(O/GX/09-7)病毒的特异性单克隆抗体6D6anti和非特异性单克隆抗体2H10anti纯度8%的SDS-PAGE电泳检测结果;

[0059] 图2为抗口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒的特异性单克隆抗体6D6anti和非特异性单克隆抗体2H10anti构象型表位的Western Blot检测结果;

[0060] 图3为抗口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒的特异性单克隆抗体6D6anti和非特异性单克隆抗体2H10anti的亚型鉴定结果;

[0061] 图4为用特异性单克隆抗体6D6anti和非特异性单克隆抗体2H10anti及ELISA 双抗体夹心法检测口蹄疫0型(O/GX/09-7)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为用特异性单克隆抗体6D6anti和非特异性单克隆抗体2H10anti制备的金标纸层析试纸条检测口蹄疫O型(O/GX/09-70)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] 所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

[0069] 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。

[0070] 实施例1、获得持续、稳定分泌抗口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞

[0071] 本实施例以口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒为免疫原免疫小鼠获得的持续、稳定分泌抗口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0072] 杂交瘤细胞株的获得包括以下步骤：

[0073] 1、动物免疫

[0074] 1)基础免疫：以口蹄疫(O/GX/09-7)病毒(由金宇保灵生物药品有限公司提供)作为免疫原(抗原)，采用蔗糖密度梯度离心法测定，纯度 $\geq 85\%$ ，浓度10⁻(1000(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(g将口蹄疫(O/GX/09-7)病毒抗原用超滤管浓缩10倍，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 μ g。

[0075] 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 μ g。在进行细胞融合前3天，腹腔注射含200 μ g抗原的生理盐水溶液，以进一步增强免疫效果。

[0076] 2、杂交瘤细胞的制备和筛选

[0077] 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℃。融合后10-15天,取上清采用间接ELISA法筛选分泌抗口蹄疫0型(0/GX/09-7)病毒的杂交瘤细胞株,间接ELISA法的操作步骤为:用110 μ L浓度为4 μ g/mL的口蹄疫0型(0/GX/09-7)病毒包板,拍干后,用1%BSA(购于Sigma公司)封闭液封闭,以免疫小鼠血清1:2000作为阳性对照,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 μ L,最后测定450nm OD值,以OD₄₅₀值大于阴性对照2倍为阳性判断依据。

[0078] 对所得阳性克隆株采用有限稀释法进行亚克隆,具体操作是:

[0079] 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。

[0080] 2) 用HT培养液将细胞稀释成200个/mL、40个/mL、20个/mL和的悬液。

[0081] 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。

[0082] 4) 5%CO₂饱和湿度,37℃培养。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 3、杂交瘤细胞的获得

[0086] 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4株针对口蹄疫0型(0/GX/09-7)病毒可稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞,分别命名为2H10、6D6、3E7、3A11。

[0087] 4、杂交瘤细胞所得单抗的效价检测

[0088] 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:1:10-1:100,表明待测上清中均存在目标抗体,其中细胞株3E7分泌的单克隆抗体(命名为3E7anti)效价略低。

[0089] 表1杂交瘤细胞培养上清的效价

[0090]

	细胞株 2H10	细胞株 6D6	细胞株 3E7	细胞株 3A11
细胞培养上清效价	1:128	1:64	1:8	1:64

[0091] 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,表明在腹水中均可以检测到目标抗体,其中3E7中略低,其余三种效价均在1:8000以上,具有应用价值。

[0092] 表2杂交瘤细胞培养上清的效价

[0093]

	细胞株2H10	细胞株6D6	细胞株3E7	细胞株3A11
小鼠腹水效价	1:32768	1:16384	1:1024	1:8192

[0094] 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pH7.4 10mM PBS稀释100倍后检测。结果如表3所示,其中细胞株6D6分泌的单克隆抗体(命名为6D6anti)和细胞株3E7分泌的单克隆抗体(命名为3E7anti)为特异性抗体,而细胞株2H10分泌的单克隆抗体(命名为2H10anti)和细胞株3A11分泌的单克隆抗体(命名为3A11anti)两种为非特异性抗体。相比较而言,3E7anti和 3A11anti抗体效价较低,故本发明选择6D6anti和2H10anti用于实验和后期检测试剂的开发。

[0095] 表3杂交瘤细胞培养上清的特异性检测

[0096]

包被抗原	杂交瘤细胞株腹水(1:100)			
	细胞株 2H10	细胞株 6D6	细胞株 3E7	细胞株 3A11
口蹄疫缅甸毒株 (O/mya98/BY/2010)	2.325	0.017	0.015	1.871
口蹄疫 A 型 (Rec-A/WH/09)	1.983	0.029	0.014	1.709
亚洲 1 型 (JSL06)	1.674	0.021	0.037	2.370
目标毒株 (O/GX/09-7)	2.897	2.913	0.748	2.502

[0097] 因此,在试剂开发过程中,可以形成下述的配对方式:

[0098] ①ELISA中:6D6anti(包被)-6D6anti(标记);6D6anti(包被)-2H10anti(标记)

[0099] ②胶体金:6D6anti(标记)-6D6anti(包被);6D6anti(标记)-2H10anti(包被) 通过上述抗体组合方式,可实现特异性检测目标抗原的目的。

[0100] 5、杂交瘤细胞的传代培养

[0101] 将以上选中的6D6或2H10杂交瘤细胞在含有10%胎牛血清的RPMI-1640(含有100U/mL青霉素和100μg/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(O/GX/09-7)病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0102] 6、保存杂交瘤细胞

[0103] 获得持续、稳定分泌抗口蹄疫O型(O/GX/09-7)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。

[0104] 保存方法包括以下步骤:

[0105] 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。

[0106] 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。

[0107] 3) 取样,台盼兰染色,计数活细胞,应在95%以上。具体地:

[0108] 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pH7.4 10mM 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) $\times 100\%$ 。

[0109] 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。

[0110] 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。

[0111] 按以上方法以口蹄疫0型(O/GX/09-7)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/GX/09-7)病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞株,名称为6D6和2H10。其中,能产生特异性单克隆抗体的细胞株6D6已于2015年9月16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.11196;产生非特异性单克隆抗体的细胞株2H10已于2015年9月16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.11195。

[0112] 实施例2、大量制备抗口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒的单克隆抗体

[0113] 一、单克隆抗体的大量制备及纯化

[0114] 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(免疫抑制剂,可引起炎症反应),每只小鼠0.5mL。7-10天后腹腔接种第16代杂交瘤细胞6D6或2H10,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。

[0115] 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 7.0-7.4 10mM PBS(配方: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.296g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g,双蒸水定溶至1000mL,测定pH值为7.0-7.4)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 7.0-7.6 20mM的PBS缓冲液,柱层析洗脱液为pH 3.5 100mM的柠檬酸缓冲液(配方:一水合柠檬酸21g加入1000mL去离子水中,用5M NaOH或4M HCl调整pH值至3.5),得到抗口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒的单克隆抗体,命名为6D6anti或2H10anti。

[0116] 二、抗体鉴定

[0117] 1、抗体纯度鉴定

[0118] 对抗口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒的单克隆抗体6D6anti或2H10anti进行还原性8%SDS-PAGE电泳鉴定。

[0119] 结果如图1,泳道M为蛋白分子量标准(kDa),泳道6D6为单克隆抗体6D6anti,泳道2H10为单克隆抗体2H10anti所示,单克隆抗体6D6anti和2H10anti的纯度在85%以上,表明纯化抗体的纯度可以满足实际需要。

[0120] 2、抗体构象型表位验证

[0121] 常规Western Blot检测方法检测抗口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒的单克隆抗体

6D6anti和2H10anti所针对的表位是构象型(表示表示该抗体针对的抗原位点为空间结构)还是线性(表示表示该抗体针对的抗原位点为线性结构),方法为:使用150 μ g 灭活口蹄疫O型(O/GX/09-7)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6D6anti和2H10anti进行Western Blot杂交检测。

[0122] 结果如图2所示,其中M为蛋白分子量标准(kDa),泳道1为单克隆抗体6D6anti,泳道2为单克隆抗体2H10anti,泳道3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)。根据本次实验结果显示单克隆抗体6D6anti和2H10anti为构象型表位,提示该抗体对可能只与天然状态的抗原反应,如抗原发生裂解、蛋白变性可能不反应。在疫苗质量控制上有应用意义。

[0123] 3、抗体类及亚类鉴定

[0124] 使用北京五康新兴科技有限公司生产的胶体金亚型鉴定测试卡检测、鉴定杂交瘤细胞6D6和2H10分泌的抗口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的单克隆抗体6D6anti和2H10anti的抗体亚型。

[0125] 结果如图3(从上至下顺序为6D6anti和2H10anti)所示,两种抗体均为IgG型,其中单克隆抗体6D6anti为IgG1;单克隆抗体2H10anti为IgG2a。

[0126] 三、单克隆抗体6D6anti和2H10anti的可变区序列测定

[0127] 提取杂交瘤细胞6D6和2H10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6D6anti的基因(6D6anti),其重链可变区编码基因DNA序列如序列表中SEQ ID No:3所示,其轻链可变区编码基因DNA序列如序列表中SEQ ID No:4所示;编码单克隆抗体2H10anti的基因(2H10anti),其重链可变区编码基因DNA序列如序列表中SEQ ID No:7所示,其轻链可变区编码基因DNA序列如序列表中SEQ ID No:8所示。将获得的DNA序列翻译成蛋白质的氨基酸序列。6D6anti的重链可变区氨基酸残基序列如序列表中的SEQ ID No:1所示,轻链可变区氨基酸残基序列如序列表中的SEQ ID No:2所示;2H10anti的重链可变区氨基酸残基序列如序列表中的SEQ ID No:5所示,轻链可变区的氨基酸残基序列如序列表中的SEQ ID No:6所示。上述序列在NCBI数据库进行比对后未显示有相同序列。

[0128] 实施例3、用单克隆抗体6D6anti、2H10anti及ELISA双抗体夹心法检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒

[0129] 一、用单克隆抗体6D6anti及ELISA双抗体夹心法检测不同浓度的口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒

[0130] 1、6D6anti既为包被抗体又为标记抗体检测不同浓度的口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒——6D6anti(包被)-6D6anti(标记)配对试剂盒

[0131] 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,因此以单克隆抗体6D6anti既为包被抗体又为标记抗体,来实现特异性检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒。

[0132] 用单克隆抗体6D6anti及ELISA双抗体夹心法检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒,检测方法包括以下步骤:

[0133] 1) 将单克隆抗体6D6anti用pH 7.0-7.4 10mM PBS缓冲溶液稀释成4 μ g/mL,向微孔板(购自厦门怡佳美实验器材有限公司)的每孔加110 μ L,4 $^{\circ}$ C下包被过夜;

[0134] 2) 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,保存;

[0135] 3) 采用过碘酸钠法和辣根过氧化物酶(HRP)标记单克隆抗体6D6anti,得到6D6anti-HRP,用酶标记抗体稀释液按照一定比例稀释成工作液备用。HRP酶标记方法具体为:

[0136] 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。

[0137] 4) 向微孔板中分别加入口蹄疫0型(0/GX/09-7)病毒梯度稀释液100 μ L/孔,病毒浓度见表4,37 $^{\circ}$ C温育1小时;

[0138] 5) 用PBST洗液(配方:Na₂HPO₄·12H₂O 58g,NaH₂PO₄·2H₂O 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7.2-7.4;使用前用双蒸水稀释20倍)洗板5次后,再加入6D6anti-HRP(1:1000-1:8000稀释) 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C温育0.5小时;

[0139] 6) 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 $^{\circ}$ C温育15min;

[0140] 7) 加入终止液(配方为:1000mL双蒸水中含有98%的硫酸27.8mL。),50 μ L/孔,读数OD₄₅₀。

[0141] 检测结果如表4所示,可以看出该6D6anti(包被)-6D6anti(标记)配对试剂盒能够检测1.875-60ng/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,且灵敏度很高。

[0142] 表4用单克隆抗体6D6anti及ELISA双抗体夹心两步法检测口蹄疫0型(0/GX/09-7)病毒的结果

[0143]

试验组	1	2	3	4	5	6	7	8
病毒浓度 ng/mL	60	30	15	7.5	3.75	1.875	阴性对 照	空白对 照
OD ₄₅₀	2.603	1.307	0.612	0.329	0.146	0.082	0.040	1.328

[0144] 2、以6D6anti为包被抗体以2H10anti为标记抗体检测不同浓度的口蹄疫0型(0/

GX/09-7) 病毒——6D6anti (包被)-2H10anti (标记) 配对试剂盒

[0145] 以特异性6D6anti为包被抗体;以非特异性2H10anti为标记抗体,采用下述方法同样也可以实现特异性检测目标抗原的目的。检测方法包括以下步骤:

[0146] 1) 将单克隆抗体6D6anti用pH 7.0-7.4 10mM PBS缓冲溶液稀释成4 μ g/mL, 96孔板的每孔加110 μ L, 4 $^{\circ}$ C下包被过夜;

[0147] 2) 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, 保存;

[0148] 3) 采用过碘酸钠法和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记单克隆抗体2H10anti, 得到2H10anti-HRP, 用酶标记抗体稀释液按照一定比例稀释成工作液备用。HRP酶标记方法具体为:

[0149] 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, 定容至1000mL; 调整pH至7.6-7.8。

[0150] 4) 向96孔板中分别加入口蹄疫0型 (O/GX/09-7) 病毒梯度稀释液100 μ L/孔, 病毒浓度见表4, 37 $^{\circ}$ C温育1小时;

[0151] 5) 用PBST洗液 (配方: Na₂HPO₄ · 12H₂O 58g, NaH₂PO₄ · 2H₂O 5.92g, NaCl 170g, Tween-20 5.0mL, Proclin 300 0.6mL, 用双蒸水定容至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2H10anti (1:1000-1:8000稀释) 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C温育0.5小时;

[0152] 6) 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, 用双蒸水定容至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, 用双蒸水定容至1000mL。) 各50 μ L/孔进行显色, 37 $^{\circ}$ C温育15min;

[0153] 7) 加入终止液 (配方为: 1000mL双蒸水中含有98%的硫酸27.8mL), 50 μ L/孔, 读数OD₄₅₀。

[0154] 检测结果如表5所示, 可以看出6D6anti (包被)-2H10anti (标记) 配对试剂盒能够检测1.875-60ng/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, 且灵敏度很高。

[0155] 表5用单克隆抗体6D6anti、2H10及ELISA双抗体夹心两步法检测口蹄疫0型 (O/GX/09-7) 病毒的结果

[0156]

试验组	1	2	3	4	5	6	7	8
病毒浓度 ng/mL	60	30	15	7.5	3.75	1.875	阴性对照	空白对照
OD ₄₅₀	2.162	1.152	0.616	0.282	0.157	0.087	0.026	1.253

[0157] 二、用单克隆抗体6D6anti、2H10anti及ELISA双抗体夹心法检测不同浓度的口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒,以确定检测方法的灵敏度,检测方法与步骤一相同

[0158] 以6D6anti既为包被抗体又为标记抗体(即6D6anti(包被)-6D6anti(标记)配对试剂盒)检测不同浓度口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒的检测结果如表4所示,该检测中拟合曲线如图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)左侧A幅所示,可以看出线性相关系数 ≥ 0.99 ,检测灵敏度可达1.875ng/mL,此时OD值为阴性对照的2倍。表明该抗体组合成的试剂盒具有良好的灵敏度。

[0159] 以6D6anti为包被抗体以2H10anti为标记抗体(即6D6anti(包被)-2H10anti(标记)配对试剂盒)检测不同浓度口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒的检测结果如表5所示,该检测中拟合曲线如图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)右侧B幅所示,可以看出线性相关系数 ≥ 0.99 ,检测灵敏度也不超过1.875ng/mL,此时OD值为阴性对照的2倍。表明该抗体组合成的试剂盒具有良好的灵敏度。

[0160] 总之,以6D6anti为包被抗体,以2H10anti或者6D6anti为标记抗体检测口蹄疫0型(O/GX/09-7),均能够实现高灵敏度检测,检测灵敏度约在2ng/mL附近。

[0161] 三、用单克隆抗体6D6anti、2H10anti及ELISA双抗体夹心法检测口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒的特异性检测

[0162] 用单克隆抗体6D6anti、2H10anti及ELISA双抗体夹心法检测口蹄疫0型(O/Mya98/BY/2010)病毒、口蹄疫0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1000ng/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℃保存),以确定检测方法的特异性,检测方法见步骤一、二。

[0163] 结果:以单克隆抗体6D6anti为包被抗体,以2H10anti或者6D6anti为标记抗体检测,口蹄疫0型(O/Mya98/BY/2010)、亚洲1型(JSL/06)和A型(Re-A/WH/09)病毒检测结果呈阴性(OD值 \leq 阴性对照的2倍),无交叉反应,而口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒检测结果呈阳性(OD值 \geq 阴性对照的2倍),说明以单克隆抗体6D6anti为包被抗体(2H10anti或者6D6anti为标记抗体),采用ELISA双抗体夹心两步法能够特异性地识别口蹄疫0型(O/GX/09-7)病毒,与口蹄疫0型(O/Mya98/BY/2010)、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。

[0164] 而以单克隆抗体2H10anti包被抗体,以2H10anti为标记抗体检测,结果显示上述口蹄疫病毒毒株均反应,表明单克隆抗体2H10anti对口蹄疫0型(O/GX/09-7)为非特异性的。以单克隆抗体2H10anti包被抗体,以6D6anti为标记抗体检测,虽然只有O/GX/09-7有阳性结果,其余不反应;但是在多种毒株混合检测时,非特异性的毒株会干扰检测,影响检测结果的准确性。

[0165] 综合考虑以上结果及应用,本发明确定单克隆抗体2H10anti或6D6anti作为ELISA双抗体夹心法检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)中的标记抗体与特异性单克隆抗体6D6anti配对使用,或者胶体金双抗体夹心法检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)中,单克隆抗体2H10anti或6D6anti作为包被抗体与特异性单克隆抗体6D6anti配对使用特异性检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒。

[0166] 四、制备用ELISA双抗体夹心法检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的试剂盒

[0167] 本发明提供一种检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的试剂盒,其中包括口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的特异性单克隆抗体6D6anti。

[0168] 具体的,可为用ELISA双抗体夹心法检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的ELISA试剂盒,其中用口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的特异性单克隆抗体6D6anti作为包被抗体包被的微孔板,和用6D6anti作为酶标抗体的酶标记抗体工作液。

[0169] 更具体的,以单克隆抗体6D6anti既作为包被抗体又作为标记抗体,用ELISA双抗体夹心两步法检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的试剂盒包括以下试剂:

[0170] 1) 预包被微孔板:预先用单克隆抗体6D6anti按照4 μ 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;

[0171] 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6D6anti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0.1-1.0 μ g/mL,每个试剂盒10.0mL。

[0172] 酶标记抗体稀释液配方为: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(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7.6-7.8。

[0173] 3) 稀释液:用于标准品和待测样品的稀释,其配方为Na₂HPO₄·12H₂O,2.9g;NaH₂PO₄·2H₂O,0.296g;NaCl,8.5g;Proclin 300,0.6mL;BSA,10g;胎牛血清,150mL;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℃保存。每个试剂盒1瓶,25mL/瓶。

[0174] 4) 洗涤液:为20倍的浓缩洗液,用前稀释。其配方为:Na₂HPO₄·12H₂O 58g,NaH₂PO₄·2H₂O 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7.2-7.4。每个试剂盒1瓶,25mL/瓶。

[0175] 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。

[0176] 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。

[0177] 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。

[0178] 9) 标准口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒阳性血清:每个试剂盒1瓶,1mL/瓶。

[0179] 10) 标准口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒阴性血清:样品稀释液可作为阴性血清使用。

[0180] 实施例4、用单克隆抗体6D6anti、2H10anti及金标纸层析试纸(卡、盒)检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒

[0181] 1、制备金标纸层析试纸

[0182] 如图5、图6所示(图5为金标纸层析试纸的正面结构图,图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/GX/09-7)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。

[0183] 金标纸层析试纸的制备方法包括以下步骤:

[0184] 1) 包被硝酸纤维素膜(NC膜)2

[0185] 用浓度为1-5mg/mL的单克隆抗体6D6anti或2H10anti包被检测线(T线),用浓度为1-5mg/mL的羊抗鼠免疫球蛋白(购自京博尔西科技有限公司)包被质控线(C线)。具体操作为:用BIODOT公司XYZ3000喷膜机将用作包被抗体的单克隆抗体6D6anti(或2H10anti)、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,37℃干燥1小时。

[0186] 2) 结合物释放垫4的制备

[0187] 2.1用胶体金标记单克隆抗体6D6anti,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15μl 0.2M碳酸钾溶液,室温静止5min。加入10μl抗体,混匀后静置30min。加入10μl 20%BSA溶液,平衡5min。加入10μl 20%PEG20000溶液,平衡30min;用离心机10000rpm,离心10min,去上清液。加入100μl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。

[0188] 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,其上标记有胶体金标记的特异性单克隆抗体6D6anti,将复溶后的金子用金标复溶液1:4稀释后按照8μl/cm的速度喷膜,37℃下放置2小时干燥,备用。

[0189] 3) 制备金标纸层析试纸

[0190] 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/GX/09-7)病毒金标纸层析试纸,可按所需大小进行切割,加干燥剂后密封保存。

[0191] 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(图7中S处),对应于检测线和质控线的部位设有观测窗(图7中C/T处)。

[0192] 2、金标纸层析试纸(卡、盒)的使用

[0193] 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6D6anti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6D6anti结合,此抗原抗体复合物流至检测线6即被固相抗体6D6anti或2H10anti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6D6anti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)。

[0194] 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/GX/09-7)病毒。

[0195] 3、用金标纸层析试剂盒检测不同浓度的口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒

[0196] 用金标纸层析试剂盒(用胶体金标记的特异性单克隆抗体6D6anti包被结合物释放垫,用单克隆抗体2H10anti包被检测线(T线))检测不同浓度(浓度分别为120、60、30、15、5ng/mL)的口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒,以检测试剂盒的灵敏度。

[0197] 检测结果显示检测灵敏度可达15ng/mL(参见图7),表明该产品具有较好的灵敏度,具有实际应用价值。

[0001]

序列表

<110> 金宇保灵生物药品有限公司

北京三联博悦生物技术有限公司

<120> 杂交瘤细胞株及其分泌的抗口蹄疫 0 型 (O/GX/09-7) 病毒的特异性单克隆抗体与应用

<130> CGCNB155120W

<160> 8

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> 6D6anti 的重链可变区

<400> 1

Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys

1 5 10 15

Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg

20 25 30

Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly

35 40 45

Gly Ser Arg Asn Tyr Lys Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser

50 55 60

Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln

65 70 75 80

Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Thr Asn

85 90 95

Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

[0002]

<210> 2

<211> 99

<212> PRT

<213> 6D6anti 的轻链可变区

<400> 2

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys

1 5 10 15

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys

20 25 30

Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His

35 40 45

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr

50 55 60

Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe

65 70 75 80

Cys Gln Gln Gly Asn Lys Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys

85 90 95

Leu Glu Ile

<210> 3

<211> 339

<212> DNA

<213> 6D6anti 重链可变区的编码基因

<400> 3

tcaggacctg gcctggtggc gccctcacag agcctgtcca tcaactgcac tgtctctggg 60

ttttcattaa ccagctatgg tgtacactgg gttcgccagc ctccaggaaa gggctctggag 120

tggctgggag taatatgggc tgggtggaage agaaattata aatcggtctt catgtccaga 180

ctgagcatca gcaaagacaa ctccaagagc caagttttct taaaaatgaa cagtctgcaa 240

actgatgaca cagecatgta ctactgtgcc agagatgggg gtaccaacce gtactacttt 300

[0003]

gactactggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctca 339

<210> 4

<211> 297

<212> DNA

<213> 6D6anti 轻链可变区的编码基因

<400> 4

ccatcctccc tgtctgcctc tctgggagac agagtcacca tcagttgcag ggcaagtcag 60

gacattagca attatttaaa ctggtatcag cagaaaccag atggaactgt taaactcctg 120

atctactaca catcaagatt acattcagga gtcccatcaa ggttcagtgg cagtgggtct 180

ggaacagatt attctctcac cattagcaac ctggagcaag aagatattgc cacttacttt 240

tgccaacagg gtaataagct tccattcagc ttcggctcgg ggaccaagct ggagatc 297

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> 2H10anti 的重链可变区

<400> 5

Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys

1 5 10 15

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg

20 25 30

Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly

35 40 45

Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile

50 55 60

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu

65 70 75 80

Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Glu Asn Tyr

85 90 95

Asp Gly Ser Ile Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6

<211> 104

<212> PRT

<213> 2H10anti 的轻链可变区

<400> 6

Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys
 1 5 10 15

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 20 25 30

[0004]

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His Gly Tyr His Thr Phe
 85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100

<210> 7

<211> 351

<212> DNA

<213> 2H10anti 重链可变区的编码基因

<400> 7

[0005]

tcagggggag gcttagtgaa gcctggaggg tccctgaaac tctcctgtgc agcctctgga	60
ttaactttca gtagctatac catgtcttgg gttegccaga ctccggagaa gaggctggag	120
tgggtcgcaa ccattagtag tggtggtagt ttcacctact atccagacag tgtgaagggc	180
cgattacca tctccagaga caatgccaaag aacacctgt acctgcaaat gagcagtctg	240
aagtctgagg acacagccat gtattactgt acaagagagg aaaattacga cggtagtatc	300
tactggtact tcgatgtctg gggccaaggg accaagggtca cegtctcctc a	351

<210> 8

<211> 312

<212> DNA

<213> 2H10anti 轻链可变区的编码基因

<400> 8

ccatcctccc tgagtgtgtc agcaggagag aaggctacta tgagctgcaa gtccagtcag	60
agtctattaa acagtggaaa tcaaaagaac tacttggcct ggtaccagca gaaaccaggg	120
cagcctccca aactgttgat ctacggggca tccactaggg aatctgggggt ccctgatcgc	180
ttcacaggca gtggatctgg aaccgatttc actettacca tcagcagtgt gcaggetgaa	240
gacctggcag tttattactg tcagaatgat catggttatc acacgttcgg aggggggacc	300
aagctggaga tc	312

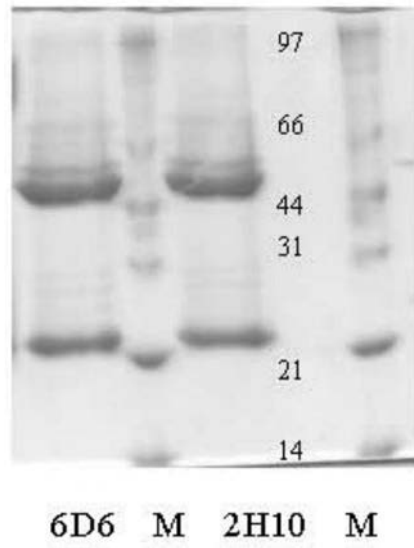


图1

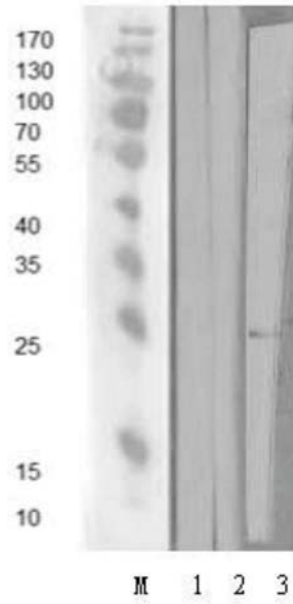
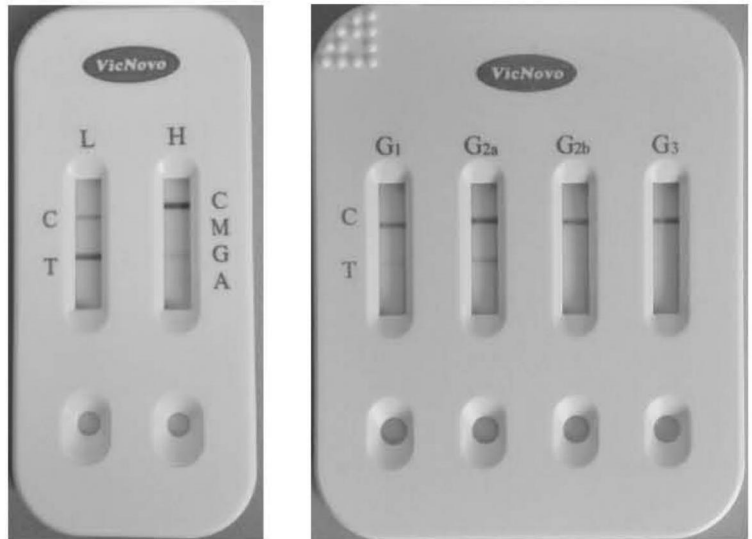


图2



6D6anti



2H10anti

图3

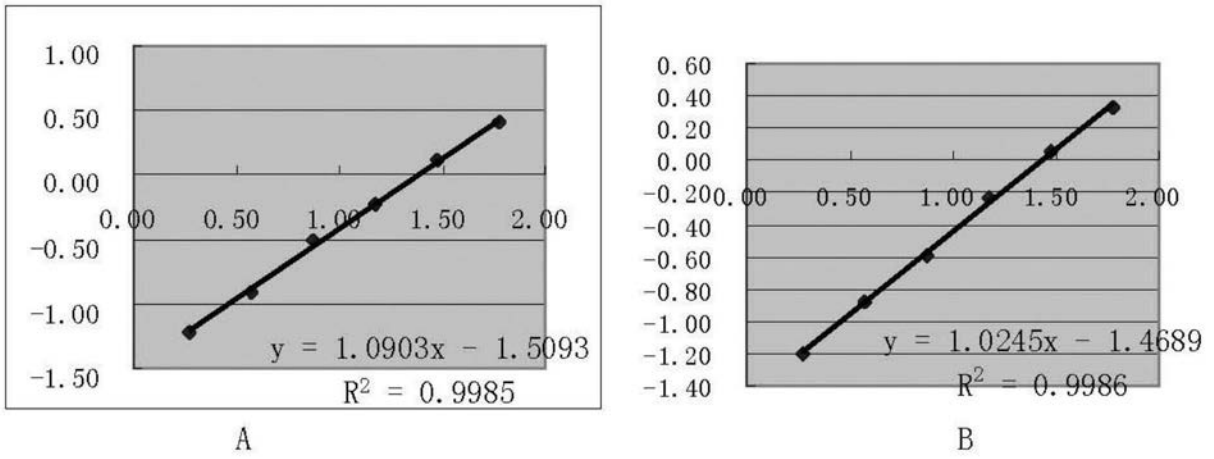


图4

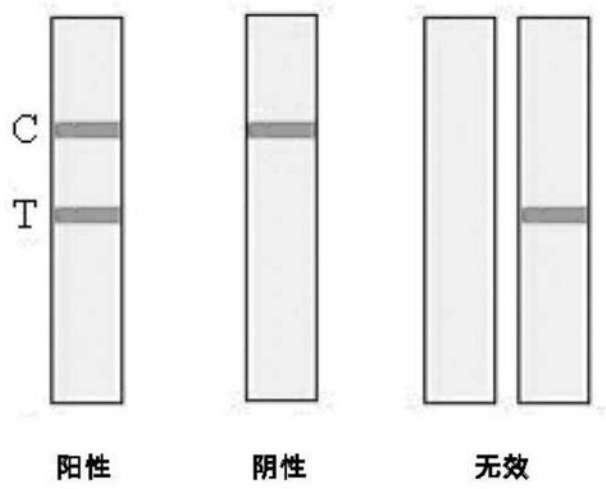


图5

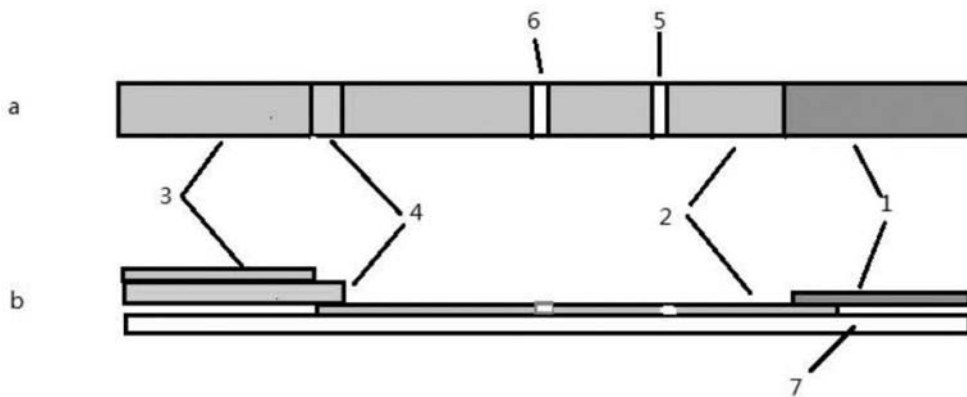


图6



图7

专利名称(译)	杂交瘤细胞株及其分泌的抗口蹄疫O型 (O/GX/09-7) 病毒的特异性单克隆抗体与应用		
公开(公告)号	CN105296435B	公开(公告)日	2019-03-12
申请号	CN201510753950.6	申请日	2015-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	金宇保灵生物药品有限公司		
申请(专利权)人(译)	金宇保灵生物药品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	金宇保灵生物药品有限公司		
[标]发明人	刘国英 郑金来 范秀丽 吴园园 任旭荣 李蓉 张燕红 郝金宝 魏学峰 商晓桂		
发明人	刘国英 郑金来 范秀丽 吴园园 任旭荣 李蓉 张燕红 郝金宝 魏学峰 商晓桂		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/10 G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/535 C12R1/91		
代理人(译)	鲁兵		
审查员(译)	温婧		
其他公开文献	CN105296435A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了能持续、稳定分泌抗口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株6D6，以及由其分泌得到的特异性单克隆抗体6D6anti。6D6anti能够特异性地识别口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒，在ELISA检测中以6D6anti作为包被及酶标抗体可用于检测口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒，并具有高特异性、高灵敏度的优点。本发明将在口蹄疫O型(O/GX/09-7)病毒的检测、疫苗生产、流行病学研究中发挥重要作用。

	细胞株 2H10	细胞株 6D6	细胞株 3E7	细胞株 3A11
细胞培养 上清效价	1:128	1:64	1:8	1:64