



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108918875 A

(43)申请公布日 2018.11.30

(21)申请号 201810283059.4

(22)申请日 2018.04.02

(71)申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山
街一号华中农业大学

(72)发明人 张安定 韩丽 任海洋 万颖
李治

(74)专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限
公司 42104

代理人 王和平 冯超

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图3页

(54)发明名称

鸽新城疫病毒单克隆抗体及在制备诊断和
检测试剂盒中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种鸽新城疫病毒单克隆抗
体及在制备诊断和检测试剂盒中的应用,该单克
隆抗体具有灵敏度好、特异性强、效价高的优点,
胶体金诊断试剂盒用于检测发病鸽或新鲜病死
鸽的肝、脾、肺、脑或心的组织匀浆液,以及口鼻
腔分泌物中是否有鸽新城疫病毒,达到辅助诊断
鸽新城疫的目的。其反应迅速,整个操作时间仅
需15min。且不需要专业技术人员,易于推广普
及。检测新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒,通过检
测样品中血清抗体对辣根过氧化物酶标记的抗
新城疫单抗结合新城疫抗原的抑制效力,来反应
血清中新城疫抗体的效价。该试剂盒操作简便、
可靠。

1. 一种鸽新城疫病毒单克隆抗体,其特征在于:所述单克隆抗体由杂交瘤细胞株 pNDVab-E分泌而得。

2. 根据权利要求1所述鸽新城疫病毒单克隆抗体,其特征在于:所述杂交瘤细胞株 pNDVab-E的制备方法如下:

1) 将鸽新城疫病毒接种在9日龄受精SFP鸡胚上,得到扩增后的鸽新城疫病毒;

2) 鸽新城疫病毒经灭活后制备疫苗,免疫小鼠后,取免疫小鼠脾细胞与SP2/0小鼠骨髓瘤细胞进行融合,得到融合细胞,然后对融合细胞进行培养,筛选得到杂交瘤细胞株 pNDVab-E。

3. 一种利用权利要求1所述鸽新城疫病毒单克隆抗体在制备鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒或检测新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒中的应用。

4. 一种鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒,其特征在于:所述胶体金试剂盒包括试纸卡、所述试纸卡包括PVC底板、及位于PVC底板表面的从加样端开始依次排列的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,其特征在于:所述金标垫上包含胶体金标记的权利要求1所述鸽新城疫病毒的单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线。

5. 根据权利要求1所述鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒,其特征在于:所述胶体金试剂盒还包括样品处理液,所述样品处理液为10mM Tris-HCl、pH为9.0。

6. 根据权利要求4所述鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒,其特征在于:所述样品垫采用10mM Tris-HCl、pH为9.0的缓冲液处理。

7. 一种权利要求4所述鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 将标记的权利要求1所述鸽新城疫病毒的单克隆抗体的胶体金均匀的喷涂在玻璃纤维素膜上,烘干得到胶体金结合物垫,即为金标垫;

2) 将权利要求1所述鸽新城疫病毒的单克隆抗体包被硝酸纤维素膜T线,作为检测线;将羊抗鼠IgG包被硝酸纤维素膜C线,作为质控线;将固相抗体硝酸纤维素膜烘干,得到反应膜;

3) 将样品垫、胶体金结合物垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在PVC底板上;切裁得到检测试纸卡,将检测试纸卡装入铝箔袋内包装制得胶体金试剂盒。

8. 一种检测新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒,包括包被灭活的新城疫病毒标准血凝抑制抗原的酶标板,辣根过氧化物酶(HRP)标记的权利要求1所述的鸽新城疫病毒的单克隆抗体,血清稀释液,洗涤液,阳性对照,阴性对照,底物液A,底物液B和终止液。

9. 根据权利要求8所述检测新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒,其特征在于:所述洗涤液每升中含有 KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g,Tween-20 50ml;

所述血清稀释液:BSA 0.2g,加洗涤缓冲液至100ml;

所述底物液A:0.2M Na_2HPO_4 25.7ml,0.1M柠檬酸24.3ml,加蒸馏水至50ml,使用前加入3% H_2O_2 150 μl ;

所述底物液B:0.2M Na_2HPO_4 25.7ml,0.1M柠檬酸24.3ml,加蒸馏水至50ml,使用前加入2mg/ml的TMB乙醇溶液2.5ml;

所述终止液:2M的 H_2SO_4 ;

所述阳性对照:新城疫血凝抑制试验标准阳性血清;

所述阴性对照：新城疫血凝抑制试验标准阴性血清。

鸽新城疫病毒单克隆抗体及在制备诊断和检测试剂盒中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及农业生物技术领域,是指一种鸽新城疫病毒单克隆抗体及在制备诊断和检测试剂盒中的应用,具体为抗鸽新城疫病毒单克隆抗体及其鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒和检测新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒。可以用于鸽新城疫病毒的现场快速诊断以及新城疫免疫后抗体的定量检测。

背景技术

[0002] 新城疫(Newcastle Disease,ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)强毒株引起的、以感染禽类为主的一种急性、高度接触性传染病。新城疫不仅可对家禽造成严重危害,对国际贸易也有严重影响。世界动物卫生组织(OIE)将新城疫列为法定报告的动物疫病,我国农业部将其列为一类动物疫病。

[0003] 尽管对该病的历史和起源还存在争议,但目前普遍认为1926年是全球第一次新城疫大流行的开始。自此之后,全球范围内共发生了四次新城疫大流行,每次大流行均由不同基因型的NDV所引起:第一次全球大流行(1920s至1960s)主要是由基因II、III和IV等三种主要基因型的NDV所引起的,危害的对象主要是鸡,水禽、鸟类等几乎不发病。第二次全球大流行(1960s至1970s)主要危害观赏鸟、笼养鸟等禽类,流行的主要基因型包括基因V和VI型。第三次全球大流行(1970s后期至1980s)首先是由鸽子引起的,主要与基因VIb亚型新城疫病毒有关。第四次全球大流行主要是由基因VII型新城疫病毒引起的,可能也起源于亚洲。目前新城疫在亚洲、非洲、中美洲和南非地区的大多数发展中国家已经成为一种地方流行性疫病,即使在一些发达国家,如日本、韩国等,近年来也有发生新城疫的报道。

[0004] 新城疫病毒属于副粘病毒科,为单链负股、不分节的RNA病毒。病毒只有1个血清型,但根据F基因的序列可分为两大类:class I和class II。其中class I类病毒为弱毒,class II类病毒又可分为18个基因型(I-XVIII):其中VII已取代II-VI型,成为鸡ND主导;VI b亚型主要威胁鸽,基因VII型、II型和I型病毒也可从鸽中分离到,但是截至目前,VI b亚型仍是导致鸽发病的最主要的基因型。

[0005] 临床上鸽感染新城疫主要表现为最急性、急性、亚急性和慢性四个临床表现型。最急性型多见于流行初期和雏鸽,常无明显症状而突然死亡。最常见的是急性型,主要表现为头颈扭曲、肌肉震颤、麻痹、共济失调和转圈等神经症状,以及畏寒缩颈、呆立、拉黄绿色稀粪等消化系统症状。亚急性和慢性型多由急性型转化而来。鸽新城疫病毒可感染不同品种、日龄、性别的鸽,但以乳鸽、青年鸽最为易感、且发病率、死亡率较高。一年四季均可发生,但以春秋季节多发,往往呈地方流行性。发病率和死亡率差异较大,与鸽的日龄、免疫水平、饲养密度、环境等密切相关。该病在我国鸽群发病和流行,并造成较高的发病率和死亡率,已遍及我国绝大多数养鸽地区。是目前威胁肉鸽和信鸽的第一大疫病。

[0006] 目前,新城疫的诊断主要有病毒分离和鉴定、血凝和血凝抑制、荧光定量PCR等免疫学和分子生物学方法。对于鸡新城疫病毒的检测已经发展了胶体金试纸条等现场快速检

测技术,但并没有针对鸽新城疫病毒检测的现场快检技术。鉴于临床上检测鸽新城疫的重大需求,研制检测鸽新城疫的现场快检技术具有重要价值和意义。

[0007] 我国于20世纪80年代对鸡新城疫实行了全面免疫的策略,对我国新城疫的防控起到了关键作用,使得流行得到一定的控制。因此,对疫苗免疫后的免疫状态进行评估是配合疫苗免疫的重要方式。由于血凝(HA)和血凝抑制(HI)方法操作简单、且不需要特殊设备,在基层被广泛应用新城疫免疫后抗体水平的监测。但该方法也存在明显缺点,如敏感性差、误差较大、且每次检出的样品量少等,缺乏一定的可靠性,在大量样品检测时需要大量人力。

[0008] 因此开发一种简便、可定量、误差小、且适合高通量检测的方法一直以来是临床大规模监测新城疫抗体的技术需求。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供了一种鸽新城疫病毒单克隆抗体在制备诊断和检测试剂盒中的应用,该单克隆抗体具有灵敏度好、特异性强、效价高的优点,利用该单克隆抗体能够制备诊断鸽新城疫病毒的胶体金试剂盒和检测新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒。

[0010] 该胶体金试剂盒可用于检测发病鸽或新鲜病死鸽的肝、脾、肺、脑或心的组织匀浆液,以及口鼻腔分泌物中是否有鸽新城疫病毒。达到辅助诊断鸽新城疫的目的。

[0011] 该竞争ELISA试剂盒可用于鸡、鸽等动物新城疫抗体水平的检测和监测,满足国家对新城疫全面免疫后大规模抗体水平监测的需求。

[0012] 为解决上述技术问题,本发明提供一种鸽新城疫病毒单克隆抗体,所述单克隆抗体由杂交瘤细胞株pNDVab-E分泌而得。该单克隆抗体能特异性的结合多个基因型新城疫病毒。可用于研制鸽新城疫和鸡新城疫病毒或其抗体的免疫学诊断试剂。

[0013] 进一步地,所述杂交瘤细胞株pNDVab-E的制备方法如下:

[0014] 1) 将鸽新城疫病毒接种在9日龄受精SFP鸡胚上,得到扩增后的鸽新城疫病毒,

[0015] 2) 鸽新城疫病毒经灭活后制备疫苗,免疫小鼠后,取免疫小鼠脾细胞与SP2/0小鼠骨髓瘤细胞进行融合,得到融合细胞,然后对融合细胞进行培养,筛选得到杂交瘤细胞株pNDVab-E。

[0016] 本发明还公开了一种利用权利要求1所述鸽新城疫病毒单克隆抗体在制备鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒或检测新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒中的应用。

[0017] 上述鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒,它包括试纸卡、所述试纸卡包括PVC底板、及位于PVC底板表面的从加样端开始依次排列的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述金标垫上包含胶体金标记的上述鸽新城疫病毒的单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜上包被有检测线(T)和质控线(C)。

[0018] 进一步地,所述胶体金试剂盒还包括样品处理液,所述样品处理液为10mM Tris-HCl、pH为9.0。

[0019] 再进一步地,所述样品垫采用10mM Tris-HCl、pH为9.0的缓冲液处理。

[0020] 上述鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0021] 1) 将标记的权利要求1所述鸽新城疫病毒的单克隆抗体的胶体金均匀的喷涂在玻璃纤维素膜上,烘干得到胶体金结合物垫,即为金标垫;

[0022] 2) 将权利要求1所述鸽新城疫病毒的单克隆抗体包被硝酸纤维素膜T线,作为检测

线;将羊抗鼠IgG包被硝酸纤维素膜C线,作为质控线;将固相抗体硝酸纤维素膜烘干,得到反应膜;

[0023] 3)将样品垫、胶体金结合物垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在PVC底板上;切裁得到检测试纸卡,将检测试纸卡装入铝箔袋内包装制得胶体金试剂盒。

[0024] 上述胶体金试剂盒检测方法如下:

[0025] 检测时,将待测样品使用样品处理液稀释后,加入到样品垫上。待测样品由于吸水垫的层析作用,先后经过检测线和质控线。当待测样品中存在新城疫病毒,则与胶体金标记的新城疫病毒的单克隆抗体结合,形成抗原抗体复合物,进而与检测区“T”线上的新城疫病毒的单克隆抗体结合,而在T线显出特异性条带,而且多余的胶体金标记的新城疫病毒的单克隆抗体会继续与“C”线上的羊抗鼠免疫球蛋白结合而显色。因此,当待测样品中存在新城疫病毒时,检测区中的“T”线和“C”线均会显红色;当待测样品中不存在新城疫病毒时,检测区中只有“C”线显红色。

[0026] 上述检测新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒,包括包被灭活的新城疫病毒标准血凝抑制抗原的酶标板,辣根过氧化物酶(HRP)标记的上述新城疫病毒的单克隆抗体,血清稀释液,洗涤液,阳性对照,阴性对照,底物液A,底物液B和终止液。

[0027] 进一步地,所述洗涤液每升中含有 KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g,Tween-20 50ml;

[0028] 所述血清稀释液:BSA 0.2g,加洗涤缓冲液至100ml;

[0029] 所述底物液A:0.2M Na_2HPO_4 25.7ml,0.1M柠檬酸24.3ml,加蒸馏水至50ml,使用前加入3% H_2O_2 150 μl 。

[0030] 所述底物液B:0.2M Na_2HPO_4 25.7ml,0.1M柠檬酸24.3ml,加蒸馏水至50ml,使用前加入2mg/ml的TMB乙醇溶液2.5ml。所述终止液:2M的 H_2SO_4 ;

[0031] 所述阳性对照:新城疫血凝抑制试验标准阳性血清;

[0032] 所述阴性对照:新城疫血凝抑制试验标准阴性血清。

[0033] 上述竞争ELISA试剂盒检测方法如下:

[0034] 检测时,将待测样品(即采集的鸡血清)使用血清稀释液稀释后,和辣根过氧化物酶(HRP)标记的上述新城疫病毒的单克隆抗体,按照1:1混合加入到酶标板的小孔内,同时设置阳性对照和阴性对照,反应完成后,使用洗涤液洗涤彻底洗涤不结合的抗体,加入底物A和底物B,显色反应完成后终止显色。

[0035] 当待测样品中存在新城疫抗体时,待测样品中的新城疫抗体会与HRP标记的单抗竞争结合到酶标板上的新城疫病毒上,而且待测样品中的新城疫抗体水平越高其竞争结合到酶标板上抗原的能力就越强,其抑制HRP标记单抗结合的能力就越强,HRP催化底物显示的能力就越弱。

[0036] 因此,可以根据HRP催化底物显示的强弱来反应样品中抗体水平的低和高,从而达到定量检测样品中新城疫抗体水平的效果。

[0037] 本发明的有益效果在于:

[0038] 本单克隆抗体可特异性地与新城疫病毒反应,与禽流感病毒等无交叉,因此可用于新城疫病毒抗体和抗原的检测。

[0039] 该胶体金试剂盒采用胶体金免疫层析技术而研制的诊断试剂,本发明胶体金试剂

盒操作简便、可靠、无需仪器设备,自带质控对照,不需任何附加试剂,显示结果明确,反应迅速,整个操作时间仅需15min。且不需要专业技术人员,易于推广普及。

[0040] 本发明新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒采用ELISA竞争法的原理而研制的诊断试剂,本发明的试剂盒操作简便、可靠、可对新城疫抗体进行定量检测,定量范围为血凝抑制效价为 2^3 - 2^8 的抗体。该方法还可配合成熟的ELISA工作站使用,适合大量样品的检测以及新城疫抗体检测需求。

附图说明

[0041] 图1为杂交瘤细胞染色体观察的结果图;

[0042] 图2为单克隆抗体纯化的结果图;

[0043] 图3为鸽新城疫病毒免疫胶体金试剂盒的敏感性图;

[0044] 图4为鸽新城疫病毒免疫胶体金试剂盒的特异性图;

[0045] 图5为新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒与病毒血凝抑制结果的线性关系图。

具体实施方式

[0046] 为了更好地解释本发明,以下结合具体实施例进一步阐明本发明的主要内容,但本发明的内容不仅仅局限于以下实施例。

[0047] 实施例1杂交瘤细胞的获得和鸽新城疫病毒单克隆抗体制备

[0048] 1、鸽新城疫病毒繁殖与纯化

[0049] (1) 采集患鸽新城的病死鸽的鼻拭子或腺胃、十二指肠、脑等组织的匀浆液,经 $0.22\mu\text{m}$ 孔径的滤器过滤除菌后,经尿囊腔途经接种9日龄SPF鸡胚,100 μL /个,湿度65%~70%,37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育,观察鸡胚死亡情况,丢弃24h之内死亡的鸡胚,并收集60~72h死亡的鸡胚尿囊液,得到扩增后的鸽新城疫病毒;

[0050] (2) 收集鸽新城疫病毒,在4 $^{\circ}\text{C}$ 以0.03%福尔马林灭活,灭活鸽新城疫病毒经HA检测,确定灭活鸽新城疫病毒液的滴度(HA滴度测定和HI检测的具体方法参见WHO,选择HA=256);

[0051] (3) 将鸽新城疫病毒灭活病毒液12000rpm离心30min,取上清,再将上清27000rpm离心4h,弃掉上清,用2ml生理盐水吹打沉淀并4 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡过夜。按照常规方法进行40%、50%、60%蔗糖密度梯度27000rpm离心4h,自上而下取出各带测HA效价;

[0052] (4) 取HA效价最高的带用生理盐水重悬,27000rpm离心2h后,弃上清,将沉淀用PBS重悬即为鸽新城疫病毒抗原液。纯化后的病毒液HA检测HA为 2^{12} 。

[0053] 2、杂交瘤的制备

[0054] (1) 小鼠免疫:

[0055] a. 将上述的鸽新城疫病毒抗原液与弗氏完全佐剂等体积混合乳化,经过背部皮下多点注射,每只注射150 μl ;

[0056] b. 首次免疫后每隔2周,分别用同样剂量的鸽新城疫病毒抗原液加弗氏不完全佐剂进行第二次和第三次免疫;

[0057] c. 第三次免疫后采血检测HI效价,当效价超过1:10000后,用鸽新城疫病毒抗原液经腹腔注射连续加强免疫3d,取小鼠脾脏细胞与SP2/0细胞融合。

[0058] (2) 细胞融合:

[0059] a. 取血清HI滴度最高的小鼠脾脏细胞与SP2/0小鼠骨髓瘤细胞相融合,先把脾脏研磨得到脾细胞悬液;

[0060] b. 然后与对数期生长的SP2/0小鼠骨髓瘤细胞按10:1比例混合,经PEG作用将两种细胞融合,融合后的细胞重悬于含HAT和20%FBS的1640完全筛选培养基,放置于37℃的5%的二氧化碳培养箱中培养;

[0061] c. 融合后第4天半量更换完全筛选培养基,第8天半量更换含HT和20%FBS的1640完全培养基。

[0062] (3) 细胞筛选:

[0063] a. 按方阵法确定纯化灭活抗原的包被浓度,用包被液为0.05mol/L pH 9.6碳酸盐缓冲液分别对纯化的新城疫抗原和SPF尿囊液进行倍比稀释,用1:800稀释的抗原液包被ELISA板,100 μ l/孔,置37℃孵育1h后,4℃包被过夜(不少于12h),PBST洗涤3次,每次拍干;

[0064] b. 以含2%BSA的PBST进行封闭,200 μ l/孔,37℃放置1h,洗涤5次,拍干;将融合后12d的细胞上清、1:1000稀释的免疫鼠阳性血清和1:10稀释的鼠阴性血清加入相应孔内,100 μ l/孔,37℃作用45min,洗涤3次,拍干;

[0065] c. 加入稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG,100 μ l/孔,37℃放置30min,洗涤5次,最后一次拍干;加入显色液TMB,100 μ l/孔,室温避光显色15min;每孔加入50 μ l 2mol/L的硫酸溶液终止反应;

[0066] d. 经酶标仪测定OD值,以空白对照调零,P为各检测孔的OD值,N为阴性参考血清的OD值,当阴性参考血清的OD值小于0.1,阳性参考血清的OD值与阴性参考血清的OD值的比值大于2,即阴、阳性对照成立的前提下,P/N大于2.0的检测孔判为阳性,小于2.0的检测孔判为阴性。隔2天后在再检测一次,选择两次检测结果均为与新城疫病毒反应为阳性孔,且P/N比值最高,同时与SPF尿囊液反应呈阴性的杂交瘤细胞株进行克隆和扩大,从而得到分泌鸽新城疫病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株pNDVab-E。

[0067] 3、杂交瘤的培养

[0068] 稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株pNDVab-E在二氧化碳培养箱中扩增培养,经96孔转移至24孔,再转移至T25细胞培养瓶经扩增培养。然后收集细胞瓶内的细胞注射到小鼠腹腔内,7~10天后从小鼠腹腔中吸取腹水。

[0069] 4、杂交瘤细胞的染色体观察

[0070] a. 取骨髓瘤细胞培养当骨髓瘤细胞生长到对数期时,向细胞板中加入秋水仙素,其终浓度0.1 μ g/ml;继续培养4h,用5ml 37℃预温的0.075mol/L的KCL吹悬细胞,37℃,30min,

[0071] b. 再加入固定液(甲醇:冰醋酸3:1) 1ml,边加边混匀,1000rpm,10min,弃上清,用5ml固定液重悬,37℃,30min,1000rpm,10min,重复一次;

[0072] c. 最后用1ml固定液重悬沉淀,取1滴,滴在预冷的载玻片上,平铺,自然干燥,用新配置的姬姆萨染液染色10min,自来水冲洗晾干,显微镜下观察。此杂交瘤细胞株的染色体数目为95条,而骨髓瘤细胞的染色体数量为65条,小鼠脾细胞染色体数为40条,证明所获得的杂交瘤细胞株pNDVab-E是两种细胞融合的结果(图1)。

[0073] 5、抗鸽新城疫单克隆抗体的亚类鉴定

[0074] 取细胞培养上清,使用SBA Clonotyping System-HRP试剂盒进行ELISA实验。具体操作如下:

[0075] (1) 用终浓度为5-10 μ g/ml的试剂盒中的捕获抗体包被ELISA板,4 $^{\circ}$ C,过夜;

[0076] (2) 弃上清,并拍干,用含2%BSA的PBST进行封闭,每孔100 μ l,37 $^{\circ}$ C,1h;

[0077] (3) PBST洗涤3次,并拍干,加入细胞上清,每孔100 μ l,37 $^{\circ}$ C,45min;PBST洗涤3次,并拍干,分别加入试剂盒中1:250~1:500倍稀释的Ig screening antibody、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA二抗,每孔100 μ l,37 $^{\circ}$ C,30min,最后显色;结果表明该抗体为IgG1亚类(表1)。

[0078] 表1抗鸽新城疫单克隆抗体亚类鉴定的结果

[0079]

E	0.6641	0.1627	0.5609	0.0795	0.1146	0.1297	0.1927
亚类	Ig	IgM	IgG1	Ig2a	Ig2b	Ig3	IgA

[0080] 6、单克隆抗体的特异性测定

[0081] 取杂交瘤培养细胞上清,采用间接ELISA的方式对鸽新城疫病毒、I型NDV病毒、II型NDV病毒、禽流感H9亚型病毒、禽流感H7亚型病毒、尿囊液进行试验,结果显示,细胞上清与鸽新城疫病毒反应最强,与其他新城疫病毒反应较强,与禽流感病毒不反应。

[0082] 表2显示:该单克隆抗体具有较好的特异性,可用于新城疫抗原和抗体的检测。

[0083] 表2:抗鸽新城疫单克隆抗体特异性测定的结果

检测病毒	鸽 NDV VI 型	I 型 NDV	II 型 NDV	IV 型 NDV	禽流感 病毒 (H9)	禽流感 病毒 (H7)	尿囊 液
OD 值	1.2580	0.6310	0.7420	0.7360	0.1250	0.1470	0.1510
结果判定	+++	++	++	++	-	-	-

[0085] 7、单克隆抗体的大量制备

[0086] 采用体内诱生腹水法制备单克隆抗体,具体步骤如下:

[0087] (1) 选择6周龄以上的BALB/C小鼠,每只腹腔内注射灭菌液体石蜡0.5ml;一周后,每只腹腔接种杂交瘤细胞0.5~1 \times 10⁶个;

[0088] (2) 植入细胞后第7天起,每天观察小鼠腹部,待小鼠腹部明显膨大,采集腹水,3000rpm离心10min,收集上清。

[0089] 8、单克隆抗体效价的测定

[0090] 用间接ELISA测定新城疫单克隆抗体小鼠腹水的效价,结果显示,腹水ELISA效价大于100000(表3)。

[0091] 表3:抗鸽新城疫单克隆抗体腹水效价测定的结果

	E
	0
	1.6254
	10
	1.5283
	100
	1.6754
[0092]	1000
	1.5288
	10000
	1.5393
	100000
	1.2967
	阴
	0.1157
	阳
	1.4493

[0093] 9、单克隆抗体的纯化

[0094] 采用辛酸-硫酸按法进行纯化,具体如下::

[0095] (1) 将腹水在4℃条件下,12000rpm离心30min,去除细胞碎片和一些杂蛋白析出物;

[0096] (2) 吸取腹水上清,加入3倍体积的乙酸钠缓冲液(pH4.0)稀释后,用0.1M NaOH调pH至4.5;

[0097] (3) 室温条件下,逐滴加入辛酸并搅拌(每毫升腹水加33μl辛酸),加入时,待前一滴溶解后再加另一滴。加入辛酸后,搅拌30min,4℃静置2h以上,使其充分沉淀;

[0098] (4) 在4℃条件下,12000离心30min,收集上清;

[0099] (5) 上清液用普通滤纸进行过滤,滤液收集到锥形瓶中,加入0.1倍体积的10×PBS(0.1M pH 7.4),并用2M NaOH调至pH7.4,冰浴至4℃放置;

[0100] (6) 上述混合液加入饱和硫酸铵,冰浴条件下边搅拌边缓慢加入硫酸铵,搅拌30min;

[0101] (7) 4℃静置过夜,在4℃条件下,12000rpm离心30min,弃上清,再短暂离心,将沉淀溶解于10mM的Tris-HCl中。终浓缩至原腹水体积的十分之一,并4℃透析过夜;

[0102] (8) 取少量透析样品经适当稀释后,在核酸蛋白定量仪上测定蛋白含量,进行SDS-PAGE电泳,分析纯化效果。结果表明纯化后抗体浓度在90%以上。

[0103] 实施例2、鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒

[0104] 1、标记鸽新城疫病毒单克隆抗体的胶体金

[0105] (1) 确定胶体金标记抗体的最适合pH值:

[0106] a. 依次取1mL纳米金溶液至9个1.5mL离心管中,再依次将1~9μL 0.1mol/L K₂CO₃溶液加入至9个离心管中调节纳米金溶液的pH值,然后在每种不同pH值的纳米金溶液中依次加入1.0mg/mL的3G1抗体20.0μL,轻轻混匀,室温静置2h,观察现象。

[0107] b. 将加入抗体后颜色没有变化、没有聚沉的纳米金混合溶液12,000rpm离心35min,收集上清,采用间接ELISA方法测定上清的OD值,并以K₂CO₃的加入量(μL)为横坐标,以吸光值为纵坐标绘制曲线图,以出现最小吸光值时对应的纳米金pH为最佳标记pH值。

[0108] (2) 确定胶体金标记抗体的最佳标记量

[0109] a.取200 μ l以调节好pH的胶体金溶液与血清反应板中,将纯化好的单克隆抗体进行4倍比稀释成不同浓度;

[0110] b.取20 μ l加入到反应板中,室温放置2h,后加入20 μ l的10%NaCl溶液,5min后观察颜色变化,记录最小标记量,在最小标记量的基础上加10%为最终标记量。

[0111] (3) 标记鸽新城疫病毒单克隆抗体的胶体金的制备与纯化:

[0112] a.量取50.0mL的纳米金置于100.0mL的小烧杯中,用0.1mol/L K₂CO₃调节其pH值;

[0113] b.搅拌状态下缓慢加入适当体积的抗体溶液,搅拌30min,加入10%BSA至终浓度为1%,继续搅拌30min,4 $^{\circ}$ C放置2h,

[0114] c.将纳米金标记物分装于两个50mL离心管中,1500rpm离心15min,吸出上清,弃沉淀;再以12,000rpm离心35min,

[0115] d.弃上清,加入标记洗涤保存液至原体积;再次以12,000rpm离心35min,弃上清,沉淀用1/10原体积的标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩的金标探针溶液(即为标记鸽新城疫病毒单克隆抗体的胶体金),置4 $^{\circ}$ C冰箱备用。

[0116] 2、胶体金结合物垫的制备

[0117] 使用金标诊断喷点系统机器,将金标溶液均匀的喷涂在玻璃纤维素膜上,置于平坦干燥处,37 $^{\circ}$ C条件下作用3h,待烘干后置于4 $^{\circ}$ C备用,得到胶体金结合物垫,即为金标垫。

[0118] 3、反应膜的制备

[0119] 使用金标诊断喷点系统机器,将单抗包被硝酸纤维素膜T线,作为检测线;用金标诊断喷点系统机器,将羊抗鼠IgG包被硝酸纤维素膜C线,作为质控线;将固相抗体硝酸纤维素膜置于37 $^{\circ}$ C烘干,后置于4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0120] 4、样品处理液的制备

[0121] 取10mM的Tris-HCl,调节pH至9.0,用0.45 μ m滤膜过滤后无菌分装。

[0122] 5、试纸卡制备

[0123] 将样品垫、胶体金结合物垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在PVC底板上。用Bio-dot切割机将粘贴好的PVC底板按照设定程序切成4mm宽的试纸卡。将检验合格的试纸卡,装入清洗干净的塑料外壳中并压紧,装入铝箔袋内,再放入1个干燥剂、1支塑料滴管,用连续封口机密封后,室温保存即可。(注意在组装、分装及封口的整个过程中要控制温度不超过30 $^{\circ}$ C,湿度不超过30%)。

[0124] 6、使用方法与结果判定

[0125] (1) 样品制备:

[0126] a.采取血样或组织研磨样。

[0127] b.样品储存在4 $^{\circ}$ C,如果一周内不能检测的样品存放于-20 $^{\circ}$ C,避免反复冻融。

[0128] c.样品的采集、运输需按照国家规定进行。

[0129] (2) 操作步骤:

[0130] a.将试纸条从密闭的包装袋中取出,放于水平桌面上;

[0131] b.用滴管从稀释好的样品管中,吸取样品,

[0132] c.逐滴加入到试纸条的样品孔内滴;

[0133] d.静置分钟,观察结果。

[0134] (3) 结果判定:

[0135] a. 阳性: 试纸在T和C区位置出现平行的紫红色或红色线, 说明样品中检测到鸽新城疫病毒。

[0136] b. 阴性: 试纸只在C区位置出现一条的紫红色或红色线, 说明样品中未检测到鸽新城疫病毒。

[0137] c. 无效: 试纸不出现任何线, 说明检测失败, 跟换试纸条进行检测。

[0138] 7、鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒的敏感性

[0139] 取检测TCID₅₀ = 10^{-4.3}/0.1ml (HA = 2⁵) 的鸽新城疫病毒, 发现其最高稀释到10倍后仍检测为阳性。

[0140] 图3所示: 其检测的灵敏度为10^{3.3}TCID₅₀ (HA = 2¹⁻²) 的NDV。

[0141] 8、鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒的特异性

[0142] 用该试纸条检测鸽新城疫病毒、I型NDV病毒、II型NDV病毒、IV型NDV病毒、VII型NDV病毒、禽流感H9亚型病毒、禽流感H7亚型病毒、禽流感H5亚型病毒、传染性支气管炎病毒、传染性喉气管炎病毒、白血病毒、马立克病毒、腺病毒和SPF鸡胚尿囊液。

[0143] 如图4所示, 检测新城疫病毒均为阳性, 其他病毒或干扰物质均为阴性, 说明该试纸条具有良好的特异性。

[0144] 9、鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒与病毒分离的符合率

[0145] 用鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒与病毒分离方法共同检测临床样品29份, 共同检测为阳性的样品为12份, 共同检测为阴性的样品为14份。无病毒分离检测为阴性, 而鸽新城疫病毒免疫胶体金试剂盒检测为阳性的样品, 表明鸽新城疫病毒免疫胶体金试剂盒具有很好的检测特异性。3份样品病毒分离呈阳性, 但鸽新城疫病毒免疫胶体金试剂盒检测为阴性, 表明该鸽新城疫病毒免疫胶体金试剂盒灵敏度低于病毒分离方法。总体而言, 鸽新城疫病毒免疫胶体金试剂盒与病毒分离具有较好的检测符合率, 可用于检测新城疫病毒。

[0146] 表4鸽新城疫病毒的胶体金诊断试剂盒与病毒分离结果的符合率

		病毒分离		符合率
		阳性	阴性	
[0147] 试纸	阳性	12	0	89.7%
	阴性	3	14	

[0148] 实施例3、检测新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒

[0149] 1、酶标板的制备方法

[0150] 用0.05M pH9.6的碳酸盐缓冲液作为包被液, 将新城疫病毒稀释后, 按100μl/孔加入反应板中, 4℃包被过夜, 次日, 弃去包被液, 按200μl/孔加入2%BSA的封闭液, 37℃孵育1h, 洗涤甩干, 室温干燥后装入包装袋, 加入干燥剂, 真空保存, 得到酶标板, 即为包被灭活的新城疫病毒标准血凝抑制抗原的酶标板。

[0151] 2、单抗的标记

[0152] (1) 取HRP 5mg溶于0.2mol/L, pH5.6醋酸盐缓冲液1ml中, 加入1%DNFB无水乙醇溶液0.1ml, 室温下轻微搅拌1h(可不做, 由于酶中a-和e-氨基很少);

[0153] (2) 加入新鲜配置的0.1mol/L NaIO₄ 0.5ml, 置4℃放置30min, 此时溶液由原棕色

变为墨绿色；

[0154] (3) 加入2.5%乙二醇1ml,室温下轻微搅拌1h,终止反应；

[0155] (4) 加入待标记的抗体5-10mg,用1.0mol/L,pH9.5CBS,调节pH值至9.0;混匀,置4℃过夜；

[0156] (5) 加入硼氢化钠溶液(新鲜配置)0.1ml,封口混匀,4℃放置3h；

[0157] (6) 逐滴加入等体积90%饱和硫酸铵(溶于PBS),混匀4℃放置1h,10000g离心10min,弃上清；

[0158] (7) 沉淀用45%硫酸铵(溶于PBS)重悬,再次离心10000g离心10min,弃上清；

[0159] (8) 使用1ml PBS溶解,对0.01mol/L,pH7.4PBS,4℃透析过夜,换液3次；

[0160] (9) 3000r/min离心30min,去除沉淀物,收集上清液；考虑使用分子量的滤膜,除去44kd和55kd的酶和抗体；

[0161] (10) 加入BSA至终浓度为5mg/ml,分装冻存,即得到辣根过氧化物酶(HRP)标记的鸽新城疫病毒的单克隆抗体。

[0162] 3、检测新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒的组成

[0163] (1) 洗涤液:KH₂PO₄ 0.2g,Na₂HPO₄-12H₂O 2.9g,NaCl 8.0g,KCl 0.2g,0.05%的Tween-20；

[0164] (2) 血清稀释液:BSA 0.2g,加洗涤缓冲液至100ml；

[0165] (3) 底物液A:0.2M Na₂HPO₄ 25.7ml,0.1M柠檬酸24.3ml,加蒸馏水至50ml,使用前加入3%H₂O₂ 150μl。

[0166] (4) 底物液B:0.2M Na₂HPO₄ 25.7ml,0.1M柠檬酸24.3ml,加蒸馏水至50ml,使用前加入2mg/ml的TMB乙醇溶液2.5ml。(5) 终止液:2M的H₂SO₄；

[0167] (6) 96孔酶标板:上述方法制备的包被灭活的新城疫病毒标准血凝抑制抗原的酶标板；

[0168] (7) HRP标记的单抗;上述方法制备辣根过氧化物酶(HRP)标记的鸽新城疫病毒的单克隆抗体；

[0169] (8) 阳性对照:购置于市场的新城疫血凝抑制试验标准阳性血清

[0170] (9) 阴性对照:购置的新城疫血凝抑制试验标准阴性血清。

[0171] 4、使用方法与结果判定

[0172] (A) 使用方法:

[0173] (1) 将标准阳性血清用血清稀释液稀释成HI分别为2、4、8、16、32、64、128、256的血清样品。

[0174] (2) 将酶标单抗原血清稀释液稀释成工作浓度。

[0175] (3) 分别取待检血清、阳性血清,阴性血清和HI分别为2、4、8、16、32、64、128、256的阳性血清样品50μl与酶标单抗充分混匀,加入到酶标版中,37℃孵育1h。洗涤3到5次。

[0176] (4) 每孔加TMB使用液100μl,室温避光反应10~15min。

[0177] (5) 每孔加入50μl终止液终止反应,酶标仪检测450吸光度值。

[0178] (B) 结果判定:

[0179] (1) 检测中阴性对照的OD值至少是阳性对照血清OD值的4倍,检测被认为有效。

[0180] (2) 根据已知HI效价的阳性血清样品的OD值,绘制标准曲线,根据标准曲线和待检

血清的检测OD值计算待检血清的HI效价。

[0181] 5、检测新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒与病毒血凝抑制结果的符合率按照操作步骤,绘制标准曲线,发现竞争ELISA试剂盒的结果与病毒血凝抑制结果在检测血凝抑制效价为 2^{3-8} 的血清时,相关性很好。应用竞争ELISA试剂盒检测80份已知HI效价的新城疫阳性血清。根据标准曲线,将待检血清OD值换算成HI效价,与已知效价进行对比。符合率达87.3% (表5)。

[0182] 表5检测新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒与病毒血凝抑制结果的线性关系

[0183]

ELISA(OD值)	0.3475	0.3961	0.4766	0.5692	0.6555	0.6922	0.7384	0.7496
竞争抑制率(%) =100×(阴性对照 OD-待测样OD)/阴 性对照OD	54.23215	47.83124	37.22891	25.03293	13.6667	8.833085	2.748266	1.273158
HI效价 (log2)	8	7	6	5	4	3	2	1

[0184] 其它未详细说明的部分均为现有技术。尽管上述实施例对本发明做出了详尽的描述,但它仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部实施例,人们还可以根据本实施例在不经创造性前提下获得其他实施例,这些实施例都属于本发明保护范围。



图1

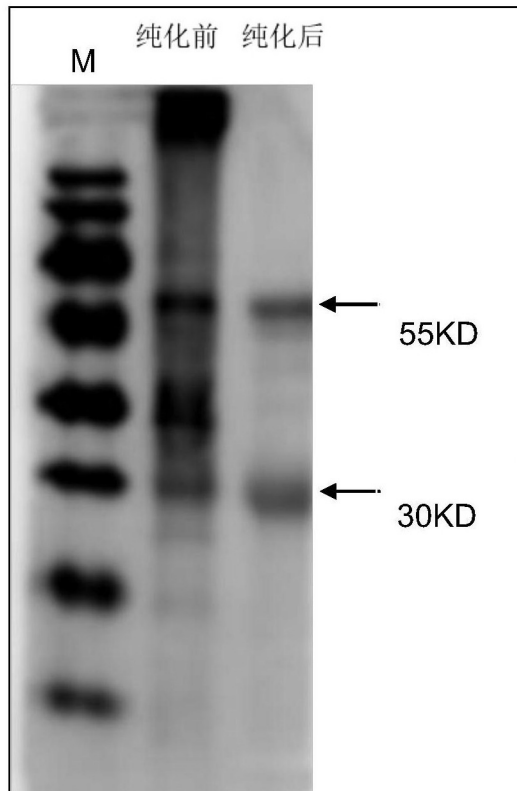


图2

NDV 稀释毒 (HA=2 ⁵)					尿囊液
1: 1	1: 5	1: 10	1: 20	1: 40	
+	+	+	+/-	-	-

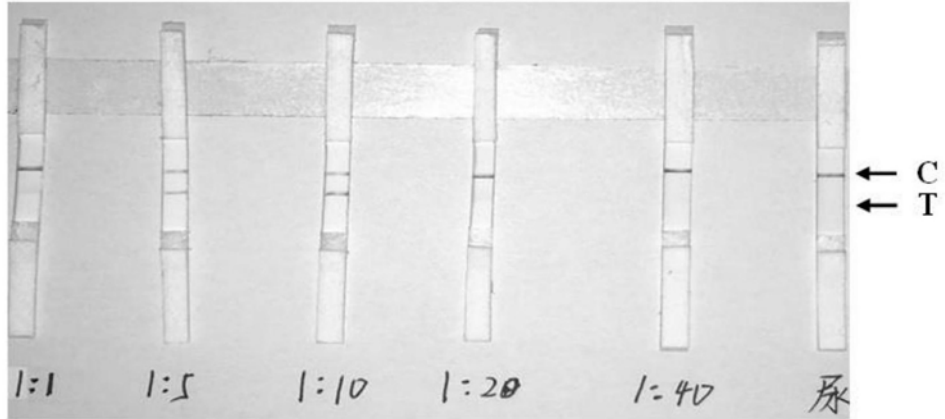


图3

检测病毒	NDV				AV			IBV		ILT	ALV	MDV	FAV
	II型	IV型	VI型	V型	H5	H7	H9	H120	H52				
结果	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

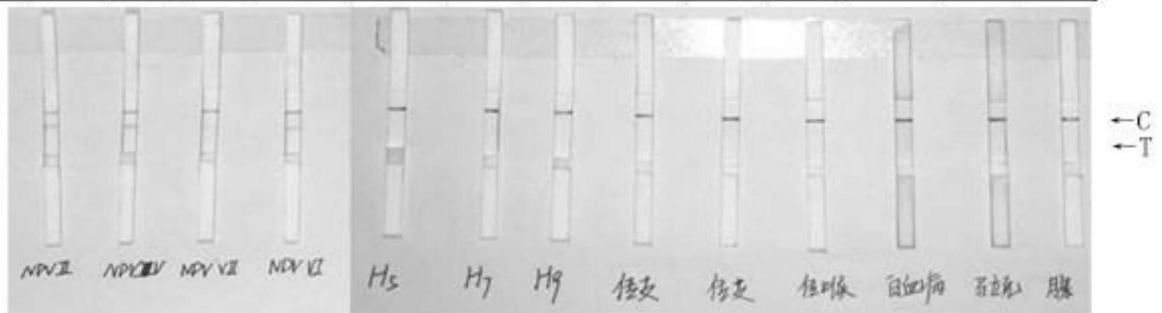


图4

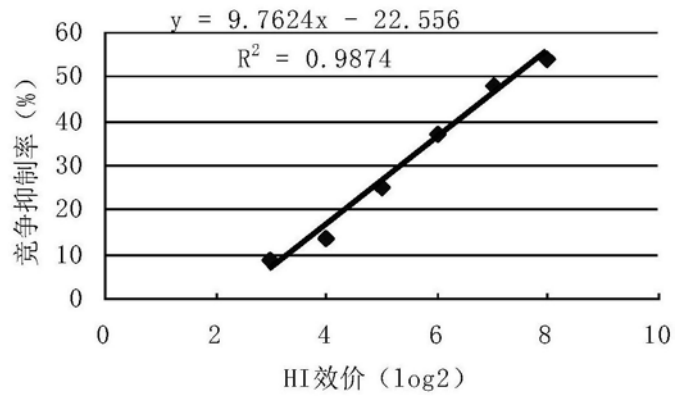


图5

专利名称(译)	鸽新城疫病毒单克隆抗体及在制备诊断和检测试剂盒中的应用		
公开(公告)号	CN108918875A	公开(公告)日	2018-11-30
申请号	CN201810283059.4	申请日	2018-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	张安定 韩丽 任海洋 万颖 李治		
发明人	张安定 韩丽 任海洋 万颖 李治		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	王和平 冯超		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种鸽新城疫病毒单克隆抗体及在制备诊断和检测试剂盒中的应用,该单克隆抗体具有灵敏度好、特异性强、效价高的优点,胶体金诊断试剂盒用于检测发病鸽或新鲜病死鸽的肝、脾、肺、脑或心的组织匀浆液,以及口鼻腔分泌物中是否有鸽新城疫病毒,达到辅助诊断鸽新城疫的目的。其反应迅速,整个操作时间仅需15min。且不需要专业技术人员,易于推广普及。检测新城疫抗体的竞争ELISA试剂盒,通过检测样品中血清抗体对辣根过氧化物酶标记的抗新城疫单抗结合新城疫抗原的抑制效力,来反应血清中新城疫抗体的效价。该试剂盒操作简便、可靠。

检测病毒	鸽NDV VI型	I型 NDV	II型 NDV	IV型 NDV	禽流感 病毒 (H9)	禽流感 病毒 (H7)	尿囊 液
OD值	1.2580	0.6310	0.7420	0.7360	0.1250	0.1470	0.1510
结果判定	+++	++	++	++	.	.	.