



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110669129 A

(43)申请公布日 2020.01.10

(21)申请号 201911051204.7

G01N 33/569(2006.01)

(22)申请日 2019.10.31

G01N 33/535(2006.01)

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:C2019146 2019.07.09

(71)申请人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市钟灵街50号

(72)发明人 钱晶 王永山 欧阳伟 王晓丽

马孙婷 夏兴霞 王晶宇 诸玉梅

(74)专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 程斯佳

(51)Int.Cl.

C07K 16/10(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

(54)发明名称

一种新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4及其应用,属于生物技术领域。本发明从建立的分泌抗新城疫病毒单克隆抗体杂交瘤细胞库中筛选出一株杂交瘤细胞1G4株,用其制备的细胞上清和诱生小鼠腹水的单克隆抗体的病毒中和效价分别为 2^{15} 和 10^8 ,该单克隆抗体识别的抗原表位是针对病毒HN蛋白的。另外,本发明检测方法用于检测动物血清中新城疫病毒血凝抑制抗体的效价,具有敏感性强、特异性高、稳定性好,适用于高通量检测血清样本,为养殖户科学评估新城疫疫苗免疫效果提供技术手段。

1. 一种新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4,其特征在于:所述单克隆抗体是由一种分泌高中和活性新城疫病毒的单克隆抗体杂交瘤细胞1G4株分泌而得的,该杂交瘤细胞1G4株于2019年7月9日保藏于中国典型培养物保藏中心,地址:中国武汉武汉大学,保藏中心保藏号CCTCC NO:C2019146,分类命名:分泌高中和活性新城疫病毒的单克隆抗体杂交瘤细胞株1G4。

2. 根据权利要求1所述的一种新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4,其特征在于:该单克隆抗体识别的抗原表位在新城疫病毒HN蛋白上。

3. 权利要求1或2所述的一种新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4的应用。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于:所述的新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4在制备新城疫病毒抗体诊断检测试剂中的应用。

5. 用权利要求1或2所述的一种新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4制备的新城疫病毒抗体诊断检测试剂盒。

6. 权利要求1或2所述的新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4经过辣根过氧化物酶标记获得的酶标单克隆抗体。

7. 用权利要求6所述的酶标单克隆抗体建立的不以诊断疾病为目的的新城疫病毒特异性抗体竞争ELISA检测方法。

一种新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4及其应用

技术领域

[0001] 本发明公开了一种新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4及其应用,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 新城疫(Newcastle disease,ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus,NDV)强毒株感染家禽引起的急性、烈性、高度接触性传染病,是我国《国家中长期动物疫病防治规划(2012—2020年)》中优先防治的一类动物疫病之一。

[0003] 近年来该病呈现出新的流行特点,如非典型性新城疫、NDV新基因(亚)型出现、宿主范围扩大和毒力增强等,使新城疫防控复杂化。目前,在生产实践中典型性的新城疫已得到较好控制,但局部地区病毒污染比较严重,疫情呈持续性地方流行(丁壮,等.新城疫流行病学新特点及鹅新城疫防控策略.中国兽医学报,2015,35(1):38-40.)。

[0004] NDV为副黏病毒科副黏病毒属的禽副黏病毒I型,基因组为不分节段的单股负链RNA,基因组结构模式为3'-NP-P-M-F-HN-L-5',依次编码六种结构蛋白:核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein,NP)、磷蛋白(Phosphor protein,P)、基质蛋白(Matrix protein,M)、融合蛋白(Fusion protein,F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白(Heamagglutinin-Neuraminidase protein,HN)和大分子蛋白(Large protein,L)以及两种非结构蛋白(V蛋白和W蛋白)(王忠田,等.新城疫病毒分子生物学最新研究进展[J].动物医学进展,2002,23(2):33-36.)。其中,HN蛋白是主要的保护性抗原,传统新城疫检测技术所涉及的血凝试验和血凝抑制试验均是基于HN蛋白的生物学活性(即具有凝集红细胞的能力)(于霏,等.鸡新城疫诊断技术[J].兽医导刊,2009(9):30-32.)。然而,上述试验常受到多种因素影响,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(达剑森,等.血凝抑制试验影响因素分析[J].畜牧与兽医,2013,45(9):108-109.)。ELISA具有特异性强、灵敏度高、稳定性好等优点,适用于大规模样品的检测,利用该方法的抗体检测对新城疫监测至关重要。

[0005] 目前针对新城疫病毒抗体检测的ELISA方法为间接ELISA和竞争ELISA(也叫阻断ELISA),然而上述方法也存在着一些局限性(检测方法中涉及试剂的特异性、敏感性、稳定性不佳)。然而,间接ELISA需额外孵育二抗的步骤,因此在时效性方面,竞争ELISA方法更具有优势。例如,张安定发明了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)标记的鸽新城疫病毒的单克隆抗体(张安定,等.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[P].公开号:CN108918875A,公开日:2018-11-30.)。然而该竞争ELISA试剂盒仅针对鸡、鸽新城疫病毒抗体的检测,再者该单克隆抗体仅描述了ELISA抗体效价,并未说明该单克隆抗体是否具有病毒中和活性或血凝抑制活性。ELISA效价,它只是反映病毒与抗体的结合能力;与ELISA效价不同,抗体的中和活性或血凝抑制活性,它能直接反映抗体中和病毒的效价或抑制血凝素HN蛋白的效价,具有明显的生物学活性。朱启运公开了一种新城疫病毒抗体检测

阻断ELISA试剂盒,其特征在于,包括:包被新城疫病毒灭活抗原的ELISA板,新城疫病毒阳性对照血清,新城疫病毒阴性对照血清,辣根过氧化物酶标记的新城疫病毒NP蛋白单克隆抗体(朱启运,等.新城疫病毒抗体检测阻断ELISA试剂盒[P]公开号:CN106596933A,公开日:2017-04-26.),然而该试剂盒中的酶标的抗体是针对新城疫病毒NP蛋白,该抗体不具有中和活性和血凝抑制活性,因此检测的抗体水平并不能代表新城疫病毒的中和抗体或血凝抑制抗体水平,需要基于HN蛋白抗体建立ELISA检测方法能够反映待检样品真实的生物学活性。

[0006] 因此,本发明选择特异性的抗体(尤其是针对新城疫病毒HN蛋白的单克隆抗体)和重组特异性抗原(例如重组HN蛋白胞外结构域)建立新城疫病毒抗体竞争ELISA检测方法用于高通量检测动物血清中新城疫病毒血凝抑制抗体效价,有望取代传统血凝抑制试验,避免结果偏差,为养殖户科学评估新城疫疫苗免疫效果提供技术手段。

发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明的目的是针对现有技术中缺少能够反映待检样品真实的生物学活性HN蛋白单克隆抗体,存在漏检、误检现象等问题,提供一种新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4及其应用,用新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4制备新城疫病毒NH蛋白单克隆抗体诊断检测试剂(酶标单克隆抗体),并以此建立新城疫病毒特异性抗体竞争ELISA检测方法,用于高通量检测动物血清中新城疫病毒血凝抑制抗体效价,有望取代传统血凝抑制试验,避免结果偏差,为养殖户科学评估新城疫疫苗免疫效果提供技术手段。

[0009] 技术方案

[0010] 为达到以上目的,是通过以下技术方案实现的:

[0011] 一种新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4,其特征在于:所述单克隆抗体是由一种分泌高中和活性新城疫病毒的单克隆抗体杂交瘤细胞1G4株分泌而得的,该杂交瘤细胞1G4株于2019年7月9日保藏于中国典型培养物保藏中心,地址:中国武汉武汉大学,保藏中心保藏号CCTCC NO:C2019146,分类命名:分泌高中和活性新城疫病毒的单克隆抗体杂交瘤细胞株1G4。该单克隆抗体识别的抗原表位在新城疫病毒HN蛋白上。

[0012] 所述的新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4可以在制备新城疫病毒抗体诊断检测试剂中应用。

[0013] 用所述的一种新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4可以制备新城疫病毒抗体诊断检测试剂盒。

[0014] 所述的新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4经过辣根过氧化物酶标记获得的酶标单克隆抗体。用所述的酶标单克隆抗体可以建立不以诊断疾病为目的的新城疫病毒特异性抗体竞争ELISA检测方法。

[0015] 有益效果

[0016] 本发明从建立的分泌抗新城疫病毒单克隆抗体杂交瘤细胞库中筛选出一株杂交瘤细胞1G4株,用其制备的细胞上清和诱生小鼠腹水的单克隆抗体的病毒中和效价分别为 2^{15} 和 10^8 ,该单克隆抗体识别的抗原表位是针对病毒HN蛋白的。

[0017] 本发明的特点和优点如下:

[0018] 1. 本发明从建立的分泌抗新城疫病毒单克隆抗体杂交瘤细胞库中筛选出一株杂交瘤细胞1G4株,其识别的抗原表位是针对新城疫病毒HN蛋白,用其制备的细胞上清和诱生小鼠腹水的单克隆抗体的病毒中和效价分别为 2^{15} 和 10^8 ,其病毒中和活性高,抗NDV毒株范围广。

[0019] 2. 本发明所述的新城疫病毒特异性抗体竞争ELISA检测方法所用的包被抗原是原核表达的重组HN蛋白(胞外结构域),而非纯化的灭活病毒或是标准血凝抑制抗原,避免了病毒培养、纯化和灭活步骤,大大降低生物材料成本。另外,该检测方法可用于鸡、鸭、鹅、鸽等禽类的新城疫免疫后血凝抑制抗体评估,具有广泛适用性。

[0020] 3. 本发明基于该单克隆抗体,通过酶联免疫技术建立了一种新城疫病毒特异性抗体竞争ELISA检测方法,以解决现有新城疫病毒血凝抑制试验存在的人工误差和操作繁琐等问题,该检测方法用于检测动物血清中新城疫病毒血凝抑制抗体的效价,具有敏感性强、特异性高、稳定性好,适用于高通量检测血清样本,提高了临床样品中的阳性检出率,避免了漏检、误检等现象。

[0021] 生物保藏

[0022] 杂交瘤细胞1G4株于2019年7月9日保藏于中国典型培养物保藏中心,地址:中国武汉武汉大学,保藏中心保藏号CCTCC NO:C2019146,分类命名:分泌高中和活性新城疫病毒的单克隆抗体杂交瘤细胞株1G4。

具体实施方式

[0023] (一) 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

[0024] 1. 抗原的制备

[0025] 将新城疫弱毒LaSota疫苗株(购自南京天邦生物科技有限公司)接种9日龄SPF鸡胚(购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司),72小时后收集尿囊液,8000r/min离心30分钟,取上清,采用PEG沉淀和不连续蔗糖密度梯度方法进行纯化,采用BCA蛋白定量检测试剂盒(赛默飞世尔科技公司产品)确定病毒浓度, -70°C 保存备用。

[0026] 2. 动物免疫

[0027] 用纯化的NDV免疫抗原经腹腔注射免疫8周龄雌性BALB/C小鼠(购自扬州大学比较医学实验中心), $50\mu\text{g}/\text{只}$ 。首免用等体积弗氏完全佐剂(Sigma公司产品)乳化抗原,之后每隔14天用弗氏不完全佐剂(Sigma公司产品)如花抗原,再免疫2次。第3次免疫后的第6天断尾采血,用间接ELISA方法测定血清抗体效价,选取其抗体效价 $>10^6$ 的小鼠,在融合前3天用纯化的NDV抗原再次加强免疫。

[0028] 3. 细胞融合

[0029] 采用PEG细胞融合方法,取生长状态良好的SP2/0骨髓瘤细胞(购自ATCC细胞库)与免疫的BALB/C小鼠脾细胞按1:5的比例,充分混匀,1000r/min离心10分钟,弃上清,用手掌轻击管底,使细胞松散均匀,置于 40°C 水浴预热,用1mL吸管在45秒内加完预热至 40°C 的50%PEG₄₀₀₀(Sigma公司产品)1mL,边加边轻轻震荡,然后在90秒内加入15mL预热至 37°C 的无胎牛血清的RPMI-1640培养基,室温静置10分钟,1000r/min离心10分钟,弃上清,加入含10%胎牛血清(FCS)(赛默飞世尔科技公司产品)和HAT(Sigma公司产品)的RPMI-1640培养基重悬,分装到已有饲养细胞的96孔板上,于5%CO₂培养箱培养。3天后补加含HAT(Sigma公

公司产品)和10%FCS(赛默飞世尔科技公司产品)的RPMI-1640培养基,5天后改用含HT(Sigma公司产品)和10%FCS(赛默飞世尔科技公司产品)的RPMI-1640培养基,10天后换成含10%FCS(赛默飞世尔科技公司产品)的RPMI-1640培养基培养,当融合的细胞生长至96孔板孔底面积的1/5时,取上清进行抗体检测。

[0030] 4. 杂交瘤细胞株的筛选

[0031] 按方阵法确定纯化NDV抗原的包被浓度,用包被液为0.05mol/L碳酸盐缓冲液(pH 9.6)对纯化的NDV抗原进行倍比稀释,用稀释至500倍的NDV抗原量包被ELISA板,100 μ L/孔,置4 $^{\circ}$ C包被过夜,PBST洗涤3次,每次5分钟,最后一次拍干;以含10%小牛血清的PBST封闭每孔,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置2小时,PBST洗涤3次,每次5分钟,最后一次拍干;将融合后12天的细胞上清、1:1000稀释的免疫小鼠阳性血清和1:1000稀释的小鼠阴性血清,加入相应孔内,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C作用1小时,PBST洗涤3次,每次5分钟,最后一次拍干;加入1:5000稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG(上海碧云天生物技术有限公司产品),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置1小时,PBST洗涤3次,每次5分钟,最后一次拍干;加入TMB底物,100 μ L/孔,室温避光显色10分钟;每孔加入50 μ L 2mol/L硫酸终止反应。经酶标仪测定OD_{450nm}值,以空白对照调零,P为各检测孔的值,N为阴性参考血清的OD_{450nm}值,当阴性参考血清的OD_{450nm}值 \leq 0.1,阳性参考血清的OD_{450nm}值与阴性参考血清的OD_{450nm}值的比值 \geq 2.1,即阴、阳性对照成立的前提下,P/N \geq 2.1的检测孔判为阳性,隔2天后再检一次,对两次检测结果均为阳性的杂交瘤细胞进行克隆化。

[0032] 5. 杂交瘤细胞的克隆化

[0033] 首先将阳性孔活细胞用台盼兰进行染色和计数,用含10%FCS(赛默飞世尔科技公司产品)的RPMI-1640培养基稀释成100个细胞/15mL培养基,将稀释的细胞悬液加入96孔细胞培养板,每孔0.15mL,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养,4天后,显微镜下可观察到克隆细胞的形成,记录下只有单个克隆生长孔,8天后取细胞上清,及时进行ELISA检测。选择阳性的单克隆细胞再进行同样的克隆3次以上,直至克隆后所有细胞孔上清检测均为阳性、且各孔检测OD_{450nm}值较接近。将克隆化的NDV特异单克隆抗体杂交瘤细胞株扩大培养,冻存。经过20次的细胞融合、筛选、克隆、鉴定,建立了稳定分泌NDV特异单克隆抗体的杂交瘤细胞库(128株)。

[0034] 6. 新城疫病毒HN蛋白胞外结构域的表达与纯化

[0035] 根据新城疫弱毒LaSota疫苗株(购自南京天邦生物科技有限公司)中HN蛋白序列信息,选取其胞外结构域(第46-577位氨基酸),经大肠杆菌密码子优化,采用人工合成方式合成相应核酸序列(由通用生物系统(安徽)有限公司合成),在其序列两端分别引入Nhe I和EcoR I酶切位点。随后,将人工合成序列与原核表达质粒pET28a(+) (北京索莱宝科技有限公司产品)分别进行Nhe I和EcoR I(宝日医生物技术(北京)有限公司产品)双酶切消化,经琼脂糖凝胶电泳鉴定后,采用凝胶回收试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司产品)分别回收片段,在T4连接酶(宝日医生物技术(北京)有限公司产品)的连接作用下,4 $^{\circ}$ C孵育16小时,转化至E.coli Rosetta感受态(宝日医生物技术(北京)有限公司产品)中,获得可以表达新城疫病毒HN蛋白的菌株。将该菌株培养至OD_{600nm}值约为1.0时,加入终浓度为1mmol/L的IPTG(宝日医生物技术(北京)有限公司产品),于37 $^{\circ}$ C诱导表达6小时,收集菌体,并经Ni-NTA亲和层析柱(GE公司产品)纯化,收集纯化的重组蛋白,经BCA蛋白定量检测试剂盒(赛默

飞世尔科技公司产品)测定其浓度为1.5mg/mL,-70℃保存备用。

[0036] 7.新城疫病毒HN蛋白(胞外结构域)单克隆抗体杂交瘤细胞株的筛选

[0037] 按方阵法确定纯化HN蛋白(胞外结构域)的包被浓度,用包被液为0.05mol/L pH 9.6碳酸盐缓冲液对纯化的HN蛋白(胞外结构域)进行倍比稀释,用稀释至0.1μg/孔,置4℃包被过夜,PBST洗涤3次,每次5分钟,最后一次拍干;以含10%小牛血清的PBST封闭每孔,200μL/孔,37℃放置2小时,PBST洗涤3次,每次5分钟,最后一次拍干;将128株稳定分泌NDV特异单克隆抗体的细胞上清(1:1000稀释)加入相应孔内,100μL/孔,37℃作用1小时,PBST洗涤3次,每次5分钟,最后一次拍干;加入1:5000稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG(上海碧云天生物技术有限公司产品),100μL/孔,37℃放置1小时,PBST洗涤3次,每次5分钟,最后一次拍干;加入TMB底物,100μL/孔,室温避光显色10min;每孔加入50μL 2mol/L硫酸终止反应。经酶标仪测定OD_{450nm}值,选取OD_{450nm}值最高数值所对应的NDV特异单克隆抗体杂交瘤细胞株。上述试验重复3次后结果显示,最后获得一株抗新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞1G4株,该杂交瘤细胞1G4株于2019年7月9日保藏于中国典型培养物保藏中心,地址:中国武汉武汉大学,保藏中心保藏号CCTCC NO:C2019146,分类命名:一种分泌高中和活性新城疫病毒的单克隆抗体杂交瘤细胞株1G4。

[0038] 8.腹水的制备

[0039] 将灭菌的液体石蜡腹腔注射8~10周龄的BALB/C小鼠(购自扬州大学比较医学实验中心),0.5mL/只,7天后,将杂交瘤细胞株注射入小鼠腹腔,每只0.2mL(含 5×10^6 个杂交瘤细胞),7~10天后采取腹部明显鼓起小鼠的腹水,3000r/min离心10分钟,收集上清,分装后于-20℃保存备用。

[0040] (二)单克隆抗体1G4的生物学特性

[0041] 1.杂交瘤细胞株染色体分析

[0042] 用姬姆萨染色法对杂交瘤细胞进行染色体计数。分别取SP2/0骨髓瘤细胞和阳性杂交瘤细胞培养,生长到对数期,向细胞瓶中加入秋水仙素,使其终浓度为0.1μg/ml,然后放入细胞培养箱中继续培养4小时。用5mL 37℃预温的0.075mol/L KCl低渗液将细胞吹起混匀,置37℃温箱作用30分钟,向其中加入新配制的固定液(甲醇:冰醋酸为3:1)1 mL,边滴加边混匀,1000r/min离心10分钟。弃上清留细胞沉淀,用5mL固定液将细胞吹起,37℃作用30分钟,1000r/min离心10分钟,重复上述操作一次。细胞沉淀用1mL固定液悬起混匀,用滴管吸取悬液1滴,滴在预先冰冻的载玻片上,平铺于载玻片上,自然干燥。用新配制的吉姆萨染液染色10分钟,自来水冲洗后晾干,置于显微镜下进行观察。此杂交瘤细胞株的染色体数量为94条,而骨髓瘤细胞的染色体的数量为54~64条,小鼠脾细胞染色体数量为40条,证明所获得的此杂交瘤细胞1G4株是两种细胞融合的结果。

[0043] 2.单克隆抗体的特异性鉴定

[0044] 实验在24孔细胞培养板中进行。将新城疫病毒LaSota株、传染性法氏囊病毒B87株、H9N2亚型禽流感病毒NJ02株、传染性支气管炎病毒M41株(以上毒株均购自南京天邦生物科技有限公司)分别接种到原代鸡胚成纤维(CEF)细胞,培养72小时病变后,吸弃细胞培养液,用无血清的培养液洗2次,然后向细胞培养孔中加入-20℃预冷的无水乙醇1mL/孔,4℃固定30分钟,用PBS洗3次,拍干;加入杂交瘤细胞1G4的培养上清液,200μL/孔,37℃孵育1小时,PBS洗涤3次,拍干;加入200倍稀释的FITC标记的羊抗鼠IgG抗体(武汉博士德生物工

程有限公司产品), 200 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育1小时, PBS洗涤5次, 置于荧光显微镜下观察。在荧光显微镜下, 单克隆抗体1G4只能与新城疫病毒株感染的CEF细胞反应, 产生荧光, 而与其他病原感染的CEF细胞无荧光, 证明单克隆抗体对NDV的特异性。

[0045] 3. 单克隆抗体的类型测定

[0046] 用单克隆抗体亚类鉴定试剂盒(赛默飞世尔科技公司产品)测定杂交瘤细胞1G4株分泌单克隆抗体的亚类, 结果显示, 该单克隆抗体亚类为IgG2a κ 。

[0047] 4. 单克隆抗体的稳定性测定

[0048] 将获得的杂交瘤细胞1G4株进行连续培养传代50次、液氮冻存与复苏试验, 用间接ELISA方法连续检测杂交瘤细胞培养上清液中的抗体效价均为 10^6 , 证明此杂交瘤细胞株1G4能持续稳定地分泌抗新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体。

[0049] 5. 单克隆抗体的效价测定

[0050] 5.1 ELISA效价测定

[0051] 用新城疫病毒株作为包被抗原的间接ELISA方法(见本发明“具体实施方式, (一) 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立, 4. 杂交瘤细胞株的筛选”章节内容)测定杂交瘤细胞培养上清和小鼠腹水的效价, 结果显示, 杂交瘤细胞1G4培养上清ELISA效价(即反应效价)为 10^5 , 腹水反应效价为 10^9 。

[0052] 5.2 病毒中和效价测定

[0053] 采用固定病毒稀释抗体的方法, 将鸡胚成纤维细胞(DF-1细胞, 购自ATCC细胞库)消化后, 接种于96孔细胞板中。将2倍(细胞上清)/10倍(小鼠腹水)系列稀释的单克隆抗体的细胞培养上清和小鼠腹水分别与等体积含200TCID₅₀的NDV悬液混合均匀, 37 $^{\circ}$ C作用1小时, 取该病-抗体混悬液每孔0.1ml接种于上述96孔细胞板中, 并设立NDV及正常DF-1细胞对照, 置37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂温箱培养, 观察结果, 单克隆抗体1G4细胞培养上清的中和效价为 2^{15} , 小鼠腹水中和效价为 10^8 。

[0054] 5.3 血凝抑制效价测定

[0055] 采用血凝抑制试验(参照中华人民共和国国家标准《GB/T16550-2008新城疫诊断技术》, 发布日: 2008-12-31, 实施日: 2009-05-01, 发布机构: 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会)对单克隆抗体1G4的细胞培养上清和小鼠腹水进行血凝抑制效价测定。结果显示, 单克隆抗体1G4的细胞培养上清和小鼠腹水进行血凝抑制效价分别为 2^{16} 和 2^{27} 。

[0056] (三) 新城疫病毒特异性抗体竞争ELISA检测方法的建立

[0057] 1. 包被抗原制备

[0058] 包被抗原(新城疫病毒HN蛋白)按照本发明具体实施方式制备(见本发明“具体实施方式, (一) 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立, 6. 新城疫病毒HN蛋白胞外结构域的表达与纯化”章节内容), 收集纯化的重组蛋白, 经BCA蛋白定量检测试剂盒(赛默飞世尔科技公司产品)测定其浓度为1.5mg/mL, -70 $^{\circ}$ C保存备用。

[0059] 2. 酶标抗体的制备

[0060] 将收获的单克隆抗体1G4(制备方法见本发明“具体实施方式, (一) 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立, 8. 腹水的制备”章节内容)用饱和硫酸铵作用2小时后, 3000r/min离心15分钟, 用2mL PBS液重悬沉淀; 随后采用抗体纯化试剂盒(赛默飞世尔科技公司产品)进行

单克隆抗体纯化,收集纯化的单克隆抗体1G4,经BCA蛋白定量检测试剂盒(赛默飞世尔科技公司产品)测定其浓度为5.7mg/mL,-70℃保存备用。

[0061] 对纯化的单克隆抗体1G4进行辣根过氧化物酶(HRP)标记,具体步骤:称取5mg辣根过氧化物酶(HRP,Sigma公司产品)溶于0.5mL蒸馏水中,加入新鲜配置的0.06mol/L NaIO₄水溶液0.5mL,混匀后置4℃30分钟,加入0.16mol/L乙二醇水溶液0.5mL,室温放置30分钟,加入纯化的单克隆抗体1G41mL混匀,装入透析袋装中,在0.05mol/L碳酸盐缓冲液(pH 9.5)中缓慢搅拌,透析6小时后把液体吸出,加入NaBH₄水溶液0.2mL,于4℃作用2小时,加入等体积饱和硫酸铵作用2小时后,12000r/min离心15分钟,将沉淀溶于2mL PBS中,加入等体积甘油,-20℃保存备用。

[0062] 3. 包被液、封闭液、稀释液、洗涤液、显色液、终止液、标准品的配制

[0063] 包被液为0.05mol/L碳酸盐缓冲液(pH 9.5),封闭液为10%小牛血清,稀释液为0.02mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4),洗涤液为含有0.5%吐温-20的0.02mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4),显色液为TMB底物显色液(天根生化科技(北京)有限公司产品),终止液为2mol/L硫酸水溶液。阴性标准品为新城疫血凝抑制试验标准阴性血清,阳性标准品为新城疫血凝抑制试验标准阳性血清(以上均购自哈尔滨维科生物技术有限公司),标准品用稀释液进行适当稀释。

[0064] 4. 检测方法的建立

[0065] 新城疫病毒特异性抗体竞争ELISA检测方法的检测步骤如下:

[0066] (1) 抗原包被:用包被液将纯化的重组新城疫病毒HN蛋白以100ng/孔包被于96孔酶标板(中国康宁Corning公司产品),37℃作用1小时;

[0067] (2) 洗涤:用洗涤液进行洗涤,在(1)中的酶标板中加入200μL洗涤液,震荡洗涤3次,每次5分钟,甩干;

[0068] (3) 封闭:在(2)的酶标板中加入200μL封闭液,37℃封闭1小时;

[0069] (4) 洗涤:重复步骤(2);

[0070] (5) 添加抗体:将酶标单克隆抗体进行1:2000稀释、标准血清进行不同稀释倍数稀释,分别各取50μL(共计100μL)加入酶标板中,37℃作用1小时(需设立阴性和阳性标准品);

[0071] (6) 洗涤:重复步骤(2);

[0072] (7) 显色:每孔加入50μL TMB显色液,室温避光显色10分钟;

[0073] (8) 终止:每孔加入50μL终止液,5分钟内读取数值;

[0074] (9) 上机检测:设定酶标仪OD_{450nm}波长,读取数值;

[0075] (10) 结果判定:竞争抑制率(%) = (竞争抗体OD_{450nm} - 样品抗体OD_{450nm}) / 竞争抗体OD_{450nm} * 100%,根据不同稀释倍数的阴性和阳性标准品测定该检测方法的竞争抑制率。结果,若竞争抑制率≥20%时,判断样品为阳性;若竞争抑制率<20%时,判断样品为阴性。

[0076] 5. 临床样品的检测与符合率比较

[0077] 利用上述建立的检测方法对采集的300份鸡血清、180鸭血清、120份鹅血清、50份鸽血清以及18份野鸟血清进行测定,同时采用传统的血凝抑制试验(参照中华人民共和国国家标准《GB/T16550-2008新城疫诊断技术》,发布日:2008-12-31,实施日:2009-05-01,发布机构:中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会)进行符合率比较。检测结果显示见表1,本发明建立的检测方法检测鸡、鸭、鹅、鸽、野鸟血清的结果

与血凝抑制试验结果的符合率在83.3%–94.3%之间,表明该检测方法具有较高特异性,提高了临床样品中的阳性检出率,避免了漏检、误检等现象,有望替代传统检测方法。

[0078] 表1临床样品的检测与符合率比较

样品	竞争 ELISA 检测方法		血凝抑制试验		符合率
	阳性	阴性	阳性	阴性	
鸡血清	244	56	227	73	94.3%
鸭血清	164	16	153	27	93.9%
鹅血清	110	10	94	26	86.7%
鸽血清	45	5	50	0	90%
野鸟血清	3	15	0	18	83.3%
合计	566	102	524	144	

[0080] 本发明从建立的分泌抗新城疫病毒单克隆抗体杂交瘤细胞库中筛选出一株杂交瘤细胞1G4株,用其制备的细胞上清和诱生小鼠腹水的单克隆抗体的病毒中和效价分别为 2^{15} 和 10^8 ,该单克隆抗体识别的抗原表位是针对病毒HN蛋白的。另外,本发明基于该单克隆抗体,通过酶联免疫技术建立了一种新城疫病毒特异性抗体竞争ELISA检测方法,以解决现有新城疫病毒血凝抑制试验存在的人工误差和操作繁琐等问题,该检测方法用于检测动物血清中新城疫病毒血凝抑制抗体的效价,具有敏感性强、特异性高、稳定性好,适用于高通量检测血清样本,提高了临床样品中的阳性检出率,避免了漏检、误检等现象。

专利名称(译)	一种新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4及其应用		
公开(公告)号	CN110669129A	公开(公告)日	2020-01-10
申请号	CN2019111051204.7	申请日	2019-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
[标]发明人	钱晶 王永山 欧阳伟 王晓丽 马孙婷 夏兴霞 王晶宇 诸玉梅		
发明人	钱晶 王永山 欧阳伟 王晓丽 马孙婷 夏兴霞 王晶宇 诸玉梅		
IPC分类号	C07K16/10 G01N33/68 G01N33/577 G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	C07K16/1027 G01N33/535 G01N33/56983 G01N33/577 G01N33/6854 G01N2333/125		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种新城疫病毒HN蛋白单克隆抗体1G4及其应用，属于生物技术领域。本发明从建立的分泌抗新城疫病毒单克隆抗体杂交瘤细胞库中筛选出一株杂交瘤细胞1G4株，用其制备的细胞上清和诱生小鼠腹水的单克隆抗体的病毒中和效价分别为215和108，该单克隆抗体识别的抗原表位是针对病毒HN蛋白的。另外，本发明检测方法用于检测动物血清中新城疫病毒血凝抑制抗体的效价，具有敏感性强、特异性高、稳定性好，适用于高通量检测血清样本，为养殖户科学评估新城疫疫苗免疫效果提供技术手段。

样品	竞争 ELISA 检测方法		血凝抑制试验		符合率
	阳性	阴性	阳性	阴性	
鸡血清	244	56	227	73	94.3%
鸭血清	164	16	153	27	93.9%
鹅血清	110	10	94	26	86.7%
鸽血清	45	5	50	0	90%
野鸟血清	3	15	0	18	83.3%
合计	566	102	524	144	