

[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 200710150190.5

[51] Int. Cl.
C12N 5/18 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年6月18日

[11] 公开号 CN 101200709A

[22] 申请日 2007.11.16

[21] 申请号 200710150190.5

[71] 申请人 协和干细胞基因工程有限公司

地址 300384 天津市南开区华苑产业区梅苑
路12号

共同申请人 董志珍

[72] 发明人 郭桂庆 何大水 黄丽华 廖晓龙
屈浩 余鸣 王冬梅 袁向飞
张金香 张丽艳 张毅 张宇光
周立 朱卫彬 董志珍 侯艳梅
肖颜 赵祥平

[74] 专利代理机构 天津才智专利商标代理有限公司
代理人 王晓红

权利要求书1页 说明书5页

[54] 发明名称

抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系、单克隆抗体及其试剂盒和用途

[57] 摘要

本发明公开了一种抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系、单克隆抗体及其试剂盒和用途，利用杂交瘤技术获得小鼠抗赤羽病病毒单克隆抗体，以赤羽病病毒作为检测系统靶抗原，通过竞争酶联免疫吸附测定方法检测待测样本中的赤羽病病毒抗体。整个检测过程仅需2.5小时，且所有试验步骤均于96孔酶标板内进行，与传统中和试验相比，省时省力，并且通量高，重复性好。

1、一种抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系，其特征在于所述细胞系的保藏号为 CGMCC NO.2174。

2、权利要求 1 所述杂交瘤细胞系分泌的抗赤羽病病毒单克隆抗体。

3、权利要求 2 所述的单克隆抗体经过碘酸钠法制备辣根过氧化物的酶标记物。

4、一种用于快速检测牛、羊血清中赤羽病病毒抗体的试剂盒，其特征在于所述的试剂盒包括权利要求 3 所述的单克隆抗体的酶标记物。

5、根据权利要求 4 所述的试剂盒，其特征在于还包括赤羽病病毒包被的酶标板、血清稀释液、酶标抗体稀释液、阳性对照、底物液。

6、权利要求 2 所述的单克隆抗体或权利要求 3 所述的酶标记物在快速检测牛、羊血清中赤羽病病毒或其抗体中的应用。

抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系、单克隆抗体及其试剂盒和用途

技术领域

本发明涉及一种动物检疫中检测抗体的方法，特别是检测牛、羊血清中赤羽病病毒抗体的方法，即抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系、单克隆抗体及其试剂盒。

背景技术

赤羽病（Akabane disease, AKAv）又名阿卡斑病，是由赤羽病病毒（Akabane virus, AKAv）引起的牛、绵羊和山羊的一种多型性传染病。以流产、早产、死胎、畸形产为特征，能引起先天性关节弯曲和水性无脑症。该病于20世纪30年代在澳大利亚的牛、绵羊和山羊群中流行，随后日本亦有报道。1972~1973年，在日本关东以西的畜群中发生原因不明的流产、早产、死产以及先天性关节弯曲—积水性无脑综合征（AH综合征），损失犊牛5万头以上。除日本、澳大利亚以外，以色列（1969）、沙特阿拉伯、科威特、也门、巴林、土耳其、印度尼西亚（1979）、韩国（1982）和阿拉伯联合酋长国（1988）等国也相继报道本病。AKAv给畜牧业造成严重的经济损失，是国际动物贸易中重点检疫对象。目前我国动物进出口检验检疫部门主要采用中和试验对进口动物血清进行赤羽病病毒抗体检测，费时费力，且受其它因素影响大，重复性不好，也不利于高通量检测。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是，提供一种分泌特异性识别抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系、单克隆抗体及其试剂盒和用途。

为了解决上述技术问题，本发明采用的技术方案是：一种抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系，所述细胞系的保藏号为CGMCC NO.2174。

所述杂交瘤细胞系分泌的抗赤羽病病毒单克隆抗体。

所述的单克隆抗体经过碘酸钠法制备辣根过氧化物的酶标记物。

一种用于快速检测牛、羊血清中赤羽病病毒抗体的试剂盒，所述的试剂盒包括上述的单克隆抗体的酶标记物。

所述的试剂盒，还包括赤羽病病毒包被的酶标板、血清稀释液、酶标

抗体稀释液、阳性对照、底物液。

上述的单克隆抗体或上述的酶标记物在快速检测牛、羊血清中赤羽病病毒或其抗体中的应用。

本发明的有益效果是：建立一种快速、准确、重复性好，利于进行高通量筛查的赤羽病病毒抗体检测方法，为动物进口检验检疫部门提供一套实用有效的试剂盒产品。

制备抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 CGMCC NO: 2174, 保藏日;2007-9-18, 分类命名：小鼠抗赤羽病病毒杂交瘤细胞株。

具体实施方式

下面结合具体实施方式对本发明作进一步详细说明：

一种抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系，所述细胞系的保藏号为 CGMCC NO.2174。

所述杂交瘤细胞系分泌的抗赤羽病病毒单克隆抗体。

所述的单克隆抗体经过碘酸钠法制备辣根过氧化物的酶标记物。

一种用于快速检测牛、羊血清中赤羽病病毒抗体的试剂盒，所述的试剂盒包括上述的单克隆抗体的酶标记物。

所述的试剂盒，还包括赤羽病病毒包被的酶标板、血清稀释液、酶标抗体稀释液、阳性对照、底物液。上述的单克隆抗体或上述的酶标记物在快速检测牛、羊血清中赤羽病病毒或其抗体中的应用。

本发明的技术方案如下：

1. 赤羽病病毒的纯化

1.1 赤羽病病毒的增殖。将 vero 细胞于含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基中，置 37°C，5%CO₂ 培养箱培养至单层生长，弃上清，加入 2ml 含有赤羽病病毒的培养上清，感染 1 小时，再加入新鲜培养液，37°C，5%CO₂ 培养箱继续培养，3-4 天后，细胞出现病变而死亡。

1.2 赤羽病病毒的纯化。将感染赤羽病病毒的 vero 细胞培养液，2000rpm 离心 10 分钟，收集上清；G25 凝胶过滤置换至缓冲液 pH7.4 磷酸盐缓冲液，再经 Q Sepharose XL 阴离子交换层析柱行“穿透式”层析，收集穿流峰；截

流分子量 30000 的浓缩管超滤浓缩。（表 1，2）

2. 小鼠抗赤羽病病毒单克隆抗体的制备及酶标记

以纯化的赤羽病病毒为抗原，常规方法免疫 6 周龄 Balb/c 小鼠，首次基础免疫使用福氏完全佐剂，每隔 3 周进行一次基础免疫，共三次，50-100 μ g/只/次，末次基础免疫后 3 周，脾内注射加强免疫，25 μ g/只；3 天后取脾，与 NS1 小鼠骨髓瘤细胞进行融合，按常规杂交瘤制备方法进行。融合 12 天后，收集单克隆生长的融合孔上清，利用 Virology Laboratory,EMAI,Camden NSW Australia 试剂盒提供的酶标板进行筛选，（表 3，4，5，6）选择反应性好，生长状态好的杂交瘤细胞进行亚克隆，得到稳定分泌抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株，命名为 AAK，液氮冻存。制备抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 CGMCC NO: 2174，保藏日;2007-9-18。

采用小鼠腹腔内诱生法，将 AAK 细胞株接种 Balb/c 小鼠腹腔， 1.5×10^6 /只，1 周后采集腹水，经 Protein G Sepharose 4FF 亲和层析柱层析，制备抗 AAK 抗体纯品。

过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶标记的 AAK，方法简述如下：

称取 5mg HRP 溶解于 1ml 蒸馏水中；向其中加入 0.2ml 新配的 0.1M NaIO₄ 溶液，室温避光搅拌 20 分钟；于 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液中透析，4 $^{\circ}$ C 过夜；向其中再加入 20 μ l 0.2M pH9.5 的碳酸盐缓冲液，然后立即加入溶于 0.01M 碳酸盐缓冲液的 AAK 抗体纯品 5mg（10mg/ml），室温避光轻柔搅拌 2 小时；加入 0.1ml 新配的 4mg/ml NaBH₄，混匀，4 $^{\circ}$ C 放置 2 小时；所得产物于 0.15M pH7.4 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 透析过夜。

3. 建立可半定量检测血清中赤羽病病毒抗体的竞争酶联免疫吸附测定方法

3.1 经纯化的赤羽病病毒包被酶标板，每孔 0.5-2 μ g 病毒，以 1%BSA 封闭后，4 $^{\circ}$ C 保存。

3.2 加入 1:10 稀释的待测血清 50 μ l，或阳性对照 50 μ l（含 0.5-2 μ g AAK 抗体），37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

3.3 加入酶标单克隆抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，含 0.05-0.1% Tween-20 的 PBS 洗 5 遍。

3.4 加入 TMB 底物液 100 μ l, 室温避光反应 5-15 分钟, 加入 50 μ l 2M H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪 450nm 检测吸光值, 得到检测结果。

4. 实施例:

本检测方法是通过一个检测牛、羊血清中赤羽病病毒抗体的竞争酶联免疫吸附测定试剂盒来实现的。该试剂盒的组成及操作方法如下:

1. 试剂盒的组成:

1.1 赤羽病病毒包被酶标板

1.2 血清稀释液

1.3 酶标抗体

1.4 酶标抗体稀释液

1.5 阳性对照

1.6 底物

2. 操作方法:

2.1 将待测血清及阳性对照用血清稀释液按 1:10 稀释, 每孔 50 μ l 加入酶标板, 并以 50 μ l 血清稀释液作为阴性对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

2.2 每孔加入酶标单克隆抗体 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, PBST 洗 5 遍。

2.3 每孔加入底物液 100 μ l, 室温避光反应 10 分钟。

2.4 每孔加入 50 μ l 2M H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪检测 450nm 吸光度值。

3. 结果判读:

3.1 阴性对照应大于 0.5

3.2 阳性对照应小于 0.1

3.3 待测标本大于 0.5 为抗体阴性, 小于 0.1 为抗体阳性, 读数介于 0.1-0.5 之间为弱阳性可疑标本。

本发明牛、羊血清中赤羽病病毒抗体的检测方法。利用杂交瘤技术获得小鼠抗赤羽病病毒单克隆抗体, 以赤羽病病毒作为检测系统靶抗原, 通过竞争酶联免疫吸附测定方法检测待测样本中的赤羽病病毒抗体。整个检测过程仅需 2.5 小时, 且所有实验步骤均于 96 孔酶标板内进行, 与传统中和试验相比, 省时省力, 并且通量高, 重复性好。

表 1 BCA 法测定纯化病毒含量

| 浓度 μg/ml | 2000 | 1500 | 1000 | 750 | 500 | 250 | 125 | 25 | 0 | 病毒 | 病毒 | Con |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD620nm | 1.031 | 0.877 | 0.634 | 0.698 | 0.358 | 0.252 | 0.164 | 0.133 | 0.155 | 0.502 | 0.356 | 0.077 |

表 2 进口单克隆抗体检测纯化病毒活性

| 病毒包被量 | 2μg | 1μg | 0.5μg | 0.25μg | 0.125μg | 0.06μg | Blank |
|---------|-------|-------|-------|--------|---------|--------|-------|
| OD450nm | 0.717 | 0.695 | 0.591 | 0.588 | 0.41 | 0.248 | 0.042 |

表 3 第二次免疫后小鼠血清效价检测

| 稀释血清 | 50 x | 100 x | 200 x | 400 x | 800 x | Control |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| 小鼠 1 | 2.312 | 2.257 | 2.142 | 1.995 | 1.667 | 0.051 |
| 小鼠 2 | 1.946 | 1.8 | 1.49 | 1.151 | 0.749 | |
| 小鼠 3 | 2.059 | 1.95 | 1.723 | 1.433 | 0.915 | |

表 4 第三次免疫后小鼠血清效价检测

| 稀释血清 | 50 x | 100 x | 500 x | 1000 x | 2000 x | 4000 x | Control |
|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|
| 小鼠 1 | 2.521 | 2.543 | 2.497 | 2.445 | 2.341 | 2.132 | 0.141 |
| 小鼠 3 | 2.509 | 2.463 | 2.26 | 2.098 | 1.736 | 0.972 | |

表 5 融合前小鼠血清效价检测

| 稀释倍数 | 500 x | 1000 x | 2000 x | 4000 x | 8000 x | 16000 x | Blank | Control |
|------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|-------|---------|
| 小鼠 1 | 0.94 | 0.744 | 0.48 | 0.273 | 0.113 | 0.076 | 0.008 | 0.02 |

表 6 AAK 及辣根过氧化物酶标记 AAK 鉴定

| | Negative | Positive | 20μg | 10μg | 5μg | 2.5μg | 1.25μg | 0.6μg |
|---------|----------|----------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| AAK 纯品 | 0.089 | 0.44 | 1.189 | 0.835 | 0.579 | 0.413 | 0.324 | 0.266 |
| AAK-HRP | | | 1.02 | 0.896 | 0.504 | 0.476 | 0.191 | 0.13 |

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系、单克隆抗体及其试剂盒和用途 | | |
| 公开(公告)号 | CN101200709A | 公开(公告)日 | 2008-06-18 |
| 申请号 | CN200710150190.5 | 申请日 | 2007-11-16 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 协和干细胞基因工程有限公司 董志珍 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 协和干细胞基因工程有限公司 董志珍 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 协和干细胞基因工程有限公司 董志珍 | | |
| [标]发明人 | 郭桂庆 何大水 黄丽华 廖晓龙 屈浩 余鸣 王冬梅 袁向飞 张金香 张丽艳 张毅 张宇光 周立 朱卫彬 董志珍 侯艳梅 肖颜 赵祥平 | | |
| 发明人 | 郭桂庆 何大水 黄丽华 廖晓龙 屈浩 余鸣 王冬梅 袁向飞 张金香 张丽艳 张毅 张宇光 周立 朱卫彬 董志珍 侯艳梅 肖颜 赵祥平 | | |
| IPC分类号 | C12N5/18 C07K16/18 G01N33/53 | | |
| 代理人(译) | 王晓红 | | |

摘要(译)

本发明公开了一种抗赤羽病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系、单克隆抗体及其试剂盒和用途，利用杂交瘤技术获得小鼠抗赤羽病病毒单克隆抗体，以赤羽病病毒作为检测系统靶抗原，通过竞争酶联免疫吸附测定方法检测待测样本中的赤羽病病毒抗体。整个检测过程仅需2.5小时，且所有试验步骤均于96孔酶标板内进行，与传统中和试验相比，省时省力，并且通量高，重复性好。

表5 融合前小鼠血清效价检测

| 稀释倍数 | 500 x | 1000 x | 2000 x | 4000 x | 8000 x | 16000 x | Blank | Control |
|------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|-------|---------|
| 小鼠 1 | 0.94 | 0.744 | 0.48 | 0.273 | 0.113 | 0.076 | 0.008 | 0.02 |