



(21) 申请号 202311127530.8

G01N 33/569 (2006.01)

(22) 申请日 2023.09.04

G01N 33/577 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:C2023120 2023.05.24

(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1号

(72) 发明人 郭爱珍 张梦雅 杨莉 陈颖钰

胡长敏 陈建国 陈曦

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所(普通

合伙) 42001

专利代理师 龚莹莹

(51) Int. Cl.

C12N 5/20 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图6页

(54) 发明名称

基因1型和2型牛病毒性腹泻病毒交叉反应性单克隆抗体及应用

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,公开了基因1型和2型牛病毒性腹泻病毒交叉反应性单克隆抗体及应用。申请人采用BVDV-1和BVDV-2的病毒粒子交叉免疫6-8周龄的雌性BALB/c小鼠,筛选出5株杂交瘤细胞,相加实验结果表明单抗2C11和5A8可用于建立双抗夹心ELISA检测试剂盒。本发明的试剂盒有良好的特异性及灵敏性,最低检测限为 10^4 个TCID₅₀的病毒;在37℃高温条件下可保存7 d;且双抗夹心ELISA的批内、批间实验表明变异系数均小于10%,重复性好;该方法为我国牛群两种BVDV的同时检测和净化提供技术支撑。

1. 一种筛选出的杂交瘤细胞株组合,所述的杂交瘤细胞株组合包括:杂交瘤细胞株(Hybridoma cell line)2C11,保藏编号为:CCTCC NO:C2023120;杂交瘤细胞株(Hybridoma cell line)5A8,保藏编号为:CCTCC NO:C2023128。

2. 权利要求1所述的杂交瘤细胞株组合分泌的单克隆抗。

3. 权利要求1所述的杂交瘤细胞株组合或权利要求2所述的单抗在制备牛病毒性腹泻病毒双抗夹心ELISA检测试剂盒中的应用。

4. 根据权利要求4所述的应用,所述的牛病毒性腹泻病毒双抗夹心ELISA检测试剂盒中捕获单抗2C11的包被浓度为4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,检测单抗5A8的稀释浓度为2.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

5. 根据权利要求4所述的应用,所述的牛病毒性腹泻病毒包括牛病毒性腹泻病毒基因1型和/或2型。

基因1型和2型牛病毒性腹泻病毒交叉反应性单克隆抗体及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及基因1型和2型牛病毒性腹泻病毒(BVDV-1和BVDV-2)交叉反应性单克隆抗体及应用。

背景技术

[0002] 牛病毒性腹泻是由黄病毒科、瘟病毒属的牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhoea virus, BVDV)引起的传染病。随着目前单克隆抗体的发展,单克隆抗体的应用涉及到了酶免疫测定技术、荧光免疫测定技术以及免疫印迹技术等方面。由单克隆抗体为基础建立的阻断ELISA、双抗夹心ELISA、竞争ELISA也用于BVDV抗原及抗体检测中。研究表明,双抗夹心ELISA的敏感性和特异性均很高,并适用大规模样品的检测。我国目前现在没有商品化的抗原检测试剂盒,并且从国外进口的试剂盒价格较贵。因此我国应尽快建立商品化的抗原检测的试剂盒,能够对大批量的样品进行检测,判断是否感染BVDV。

[0003] 由于BVDV感染率和发病率较高,可通过多种途径在不同物种之间交叉传播;妊娠母牛感染后导致持续性感染牛的存在,不断向外界排毒导致BVDV在世界范围内广泛传播。同时,一些牛源性的生物制品也会存在BVDV的污染,主要包括了胎牛血清、疫苗等。流行病学证据表明,我国流行的主要是BVDV基因1型,但近年来发现基因2型有增加趋势。对BVDV的两种基因型感染进行早期检测,可为精准防控提供依据,有利于减少牛场的经济损失,提升牛场的经济效益。

[0004] 针对上述问题,本发明提供了两种可同时识别BVDV-1和BVDV-2的单克隆抗体,通过相加实验表明,这两个单克隆抗体2C11和5A8的AI值最大,AI值达到了87%,表明两者处于不同抗原表位,因此利用这两个单抗建立了双抗夹心ELISA(Dual antibodies sandwich ELISA, DAS-ELISA)检测方法,并证实该方法可以同时检测BVDV-1和BVDV-2。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供基因1型和2型牛病毒性腹泻病毒交叉反应性单克隆抗体,所述的单克隆抗体包括两个单抗2C11和5A8,分别由保藏编号为:CCTCC NO:C2023120和CCTCC NO:C2023128的杂交瘤细胞分泌得到。

[0006] 本发明的另一个目的是提供上述单抗在制备双抗夹心ELISA检测试剂盒中的应用,该单克隆抗体能够特异性识别BVDV-1和BVDV-2,可以为建立同时检测BVDV-1和BVDV-2的新型方法提供技术支持。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供了如下方案:

[0008] 申请人采用BVDV-1、BVDV-2的病毒粒子交叉免疫6-8周龄的雌性BALB/c小鼠,细胞融合后通过4轮筛选及3次亚克隆,共得到5株杂交瘤细胞株,分别命名为2C11、4F7、5A8、5B8和5E4;间接免疫荧光实验与Western Blotting表明5株杂交瘤细胞所分泌的单抗与BVDV-1、BVDV-2均有较好的反应性和特异性,且不和细胞碎片反应;5株杂交瘤细胞均没有中和活

性和阻断作用;亚类鉴定表明5株单抗的重链分别为IgG1、Ig2b,轻链均为Kappa;这五株杂交瘤细胞均有很好的传代稳定性,相加实验结果表明单抗2C11和5A8可用于建立双抗夹心ELISA方法(Dual antibodies sandwich ELISA,DAS-ELISA),因此,申请人将可分泌生产2C11和5A8单抗的杂交瘤细胞于2023年05月24日送至中国典型培养物保藏中心保藏,单抗2C11对应的杂交瘤细胞的分类命名为:杂交瘤细胞株(Hybridoma cell line)2C11,保藏编号为:CCTCC NO:C2023120;单抗5A8对应的杂交瘤细胞的分类命名为:杂交瘤细胞株(Hybridoma cell line)5A8,保藏编号为:CCTCC NO:C2023128。

[0009] 上述单克隆细胞组合分泌产生的单抗也属于本发明的保护范围。

[0010] 本发明的保护范围还包括,上述杂交瘤细胞组合,或该组合分泌产生的单克隆抗体在制备同时检测BVDV-1和BVDV-2的DAS-ELISA检测试剂盒中的应用。

[0011] 以上所述的应用中,优选的,所述的双抗夹心ELISA检测试剂盒为BVDV的DAS-ELISA检测试剂盒。

[0012] 以上所述的应用中,优选的,所述的BVDV的DAS-ELISA检测试剂盒中捕获单抗2C11的包被浓度为4 μ g/mL,检测抗体5A8的稀释浓度为2.1 μ g/mL。

[0013] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0014] 本发明提供的单克隆抗体2C11和5A8能够特异性识别BVDV-1和BVDV-2,相加实验结果表明单抗2C11和5A8可用于建立DAS-ELISA,为同时检测BVDV-1和BVDV-2提供技术支持。

[0015] 利用DAS-ELISA对样品进行检测,与金标准qPCR相比,检测粪便样品时,诊断敏感性为82.4%(95%CI:55.8%-95.4%)、诊断特异性为91.3%(95%CI:70.5%-98.5%)及符合率为87.5%(95%CI:73.2%-95.8%);检测血清样品时,诊断敏感性为83.3%(95%CI:69.2%-92.0%)、诊断特异性为86.7%(95%CI:58.3%-97.8%)及符合率为84.1%(95%CI:69.0%-93.8%);该方法有良好的分析特异性及分析灵敏度,最低检测限为10⁴个TCID₅₀的病毒;在37℃高温条件下可保存7d;批内、批间实验表明变异系数均小于10%,重复性好,表明该DAS-ELISA方法可为我国牛群两种BVDV的检测和净化提供技术支撑。

附图说明

[0016] 图1为MDBK接种不同基因型的BVDV后出现的变化示意图;

[0017] 其中:图A-B分别为接种致细胞病变型的BVDV-1后48、72h后的病变;C为接种非致细胞病变型的BVDV-2后72h后的变化,D为正常细胞对照。

[0018] 图2为使用rProtein G Breads 4FF纯化IgG类型的腹水后的SDS-PAGE鉴定图;

[0019] 其中,泳道:1为腹水上样液、2为腹水穿流液,3-14为抗体洗脱液。

[0020] 图3为纯化后单抗的SDS-PAGE鉴定图;

[0021] 其中:泳道1-5分别是单抗2C11、4F7、5A8、5B8、5E4。

[0022] 图4为单抗亚型鉴定结果。

[0023] 图5为Western blotting鉴定单克隆抗体特异性图;

[0024] 其中:图a-e分别是单抗5B8、5A8、5E4、4F7、2C11。

[0025] 图6为杂交瘤细胞的染色体计数图;

[0026] 其中:图A-E分别是杂交瘤细胞株2C11、4F7、5A8、5B8、5E4。

- [0027] 图7为单克隆抗体与接种BVDV-1毒株的间接免疫荧光的鉴定结果；
[0028] 其中：图A-E分别是单抗2C11、5B8、4F7、5A8、5E4，F是空白对照。
[0029] 图8为单克隆抗体与接种BVDV-2毒株的间接免疫荧光的鉴定结果；
[0030] 其中：图A-E分别是单抗2C11、5B8、4F7、5A8、5E4，F是空白对照。
[0031] 图9为DAS-ELISA的特异性图。

具体实施方式

[0032] 本发明所述技术方案，如未特别说明，均为本领域的常规技术；所述试剂或材料，如未特别说明，均来源于商业渠道。

[0033] 实施例1：

[0034] BVDV-1和BVDV-2病毒的扩大培养及纯化

[0035] 1. BVDV-1 (Bovine Viral Diarrhea Virus 1)、BVDV-2 (Bovine Viral Diarrhea Virus 2) 病毒的扩大培养

[0036] 牛肾细胞系 (Madin-Darby Bovine Kidney Cells, MDBK) 细胞在显微镜下视野为完整的单层细胞时，进行传代。传代后贴壁4-6h后，同步接种致细胞病变型的BVDV AV69毒株 (BVDV-1) 及非致细胞病变型的BVDV XJ-04毒株 (BVDV-2)，致细胞病变型毒株待细胞病变达到90%以上、非致细胞病变型毒株接毒后72h后，将细胞瓶在负80℃冰箱内进行三冻三融后收获病毒。参见图1。

[0037] 2. BVDV-1、BVDV-2病毒粒子的蔗糖密度梯度纯化

[0038] 三冻三融后，对收集到的含病毒的培养液进行差速离心去除细胞碎片，在卧式离心机中4000r/min, 20min; 8000r/min, 30min。差速离心后收集上清，并用0.22μm孔径的滤器进行过滤。使用Beckman高速冷冻离心机的SW37Ti转头，对差速离心处理过的病毒液进行超速离心，4℃条件下，3,0000r/min离心2h后弃去上清，超离后软管底部即为超速离心后的病毒粒子，每管用200μL的PBS在4℃条件下过夜溶解沉淀。使用Beckman高速冷冻离心机的SW41Ti吊篮，在13.2mL的超离软管使用带有长针头的注射器分别装入20%、35%、45%、60%的蔗糖层，在最上面加入超速离心后的病毒粒子，3,0000r/min离心2h后，在35%-45%的蔗糖层出现了白色分层，取白色分层后用PBS进行重悬，再次超速离心进行脱糖，沉淀用PBS重悬后即为纯化后的病毒粒子，并使用BCA法测定纯化后的病毒浓度分别为 $C_{\text{BVDV-1}} = 1\text{mg/mL}$ ， $C_{\text{BVDV-2}} = 2.5\text{mg/mL}$ 。

[0039] 实施例2：

[0040] 单克隆抗体的制备、纯化以及生物素标记

[0041] 1. 动物的免疫

[0042] 分别用实施例1制备的纯化后BVDV-1、BVDV-2的病毒粒子交叉免疫4只6-8周龄的BALB/c的雌性小鼠，首次免疫时，使用弗氏完全佐剂与纯化后的病毒乳化后进行皮下免疫，100μg/只，每次间隔2周，第二次、三次、四次免疫均是纯化后的病毒与弗氏不完全佐剂乳化进行皮下免疫，100μg/只，第四次免疫后，使用小鼠的阳性血清和阴性血清做方阵滴定实验确定最佳病毒的包被量。

[0043] 2. 间接ELISA方法的建立

[0044] 使用纯化后的BVDV-1、BVDV-2病毒粒子作为包被抗原，免疫后小鼠的阳性血清作

为阳性对照,空白小鼠血清作为阴性对照,确定最佳包被抗原浓度。具体步骤如下,将纯化的BVDV-1、BVDV-2用包被液按照8 μ g/mL、4 μ g/mL、2 μ g/mL、1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.25 μ g/mL梯度稀释,按100 μ L/孔加入ELISA板,4 $^{\circ}$ C过夜包被。PBST洗板5次,2min/次;加入1%的鱼明胶,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭1.5h。PBST洗板5次,2min/次;将阴、阳性血清分别用PBS按1:100倍稀释,按100 μ L/孔加入ELISA板中,37 $^{\circ}$ C反应45min。PBST洗板5次,2min/次;将HRP标记的羊抗牛二抗按1:5000稀释加入ELISA板,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C反应30min。PBST洗板5次,2min/次;使用显色液,分别加入底物A、B液到ELISA板,50 μ L/孔,避光显色10min后加入终止液,50 μ L/孔。终止后使用OD630nm读数。确定了血清稀释度为100倍时,BVDV-1、BVDV-2的最佳抗原包被量为2 μ g/mL,可用于间接ELISA方法的建立。

[0045] 3. 免疫小鼠效价的测定

[0046] 使用最佳抗原包被量,分别将纯化后的BVDV-1、BVDV-2病毒粒子包被到ELISA反应板中,孵育梯度稀释的免疫后小鼠的阳性血清以及空白小鼠的阴性血清,其余方法同2。选择血清效价高的阳性小鼠进行冲击免疫,腹腔注射BVDV-1及BVDV-2病毒粒子,200 μ g/只,冲击免疫后3-5天内进行细胞融合。使用BVDV-1病毒粒子包被,小鼠的阴、阳性血清作为一抗孵育进行检测,根据阳性血清/阴性血清 >2.1 为范围,得出1号、2号、4号的小鼠的血清效价可达到 2.56×10^4 ,3号小鼠的血清效价可达到 5.12×10^4 ;使用BVDV-2病毒粒子包被进行检测,小鼠的阴、阳性血清作为一抗孵育进行检测,1号、2号、3号、4号的小鼠的血清效价可达到 2.048×10^5 ;结果表明,3号小鼠的血清效价最高,选取3号小鼠进行冲击免疫,腹腔注射BVDV-1、BVDV-2病毒粒子各100 μ g,不添加佐剂,三天后进行细胞融合实验。

[0047] 4. 单克隆抗体的制备

[0048] 取空白的6-8周龄的BALB/C小鼠,眼球放血作为阴性对照,取冲击免疫后的3号BALB/c小鼠,眼球放血作为阳性对照,脱颈处死后在75%的酒精中浸泡5min后,将小鼠放在平皿内,小鼠头向左,四肢朝内,此时脾脏在小鼠侧上方,在超净工作台中首先用灭菌的镊子、剪刀钝性分离打开皮毛,暴露腹腔,接着用新的剪刀、镊子打开腹腔,使得脾脏暴露,最后用新的剪刀、镊子取脾脏于无菌的研磨器,并加入4mL的1640培养基研磨充分,直至脾脏组织变白,使用1640培养基进行洗涤细胞,静置3min吸取研磨器最上层液体3mL,并加入等量的培养基混匀,按照以上步骤重复10次,洗涤后1500r/min离心10min,用10mL含有20% FBS的HAT选择培养基重悬,即为饲养细胞和免疫脾细胞,放置备用。

[0049] 融合前一周,复苏冻存的骨髓瘤细胞,使用含有15%FBS、2%双抗的完全培养基进行培养,选择状态好的骨髓瘤细胞进行细胞融合。

[0050] 细胞融合前,将纯1640培养基、PEG放于37 $^{\circ}$ C培养箱预热,接着用纯1640培养基重悬细胞培养瓶内的骨髓瘤细胞,1500r/min离心10min后,将免疫脾细胞和SP2/0细胞混合一起,1500r/min离心10min后,去上清,离心期间打开37 $^{\circ}$ C水浴锅。使用吸水纸吸干管壁,保证离心管管壁没有其他成分,以免干扰细胞融合。接着把离心管在超净工作台上来回划几次,使细胞沉淀松动,将离心管置于37 $^{\circ}$ C水浴中。计时器调13.5min,首先在第1min内,边混合边加入0.8mL 50%的PEG4000;第2min在水浴中静置,使充分融合;第3-4min,边混合边加2mL终止液,力度比加PEG时要轻,每分钟1mL;第5-6min,边混合边加10mL终止液,每分钟5mL;第7-8min,边混合边加10mL终止液,每分钟mL;第9-10min,边混合边加10mL终止液,每分钟5mL;直至终止液加完,全过程一般不超过11min。离心10min后,弃上清,加HAT培养基重悬,

再与10mL饲养细胞混合,定容至100mL,铺板5块,200 μ L/孔,编号后在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。

[0051] 融合4d后,对细胞板进行补液,六天后换液,待细胞团长至视野的1/4时,进行换液,换液后24-48h内进行间接ELISA的检测,筛选阳性杂交瘤细胞。

[0052] 利用有限稀释法对筛选到的阳性杂交瘤细胞进行计数,计数后对杂交瘤细胞进行亚克隆,保证亚克隆后每个孔内含有单个细胞,亚克隆约3-4次,直至保证杂交瘤细胞100%的阳性率,并对亚克隆孔进行扩大与冻存。经过4次筛选及3次亚克隆,获得5株能特异地和BVDV-1、BVDV-2反应的单克隆抗体,且不和细胞碎片反应,分别命名为2C11、4F7、5A8、5B8、5E4。

[0053] 5.腹水的制备及纯化

[0054] 取8-12周龄的雌性BALB/c小鼠,每只腹腔注射500 μ L弗氏不完全佐剂,3d后腹腔注射用1640培养基重悬后的上述筛选出的阳性杂交瘤细胞,每只小鼠约注射 1×10^6 个杂交瘤细胞。同时一只小鼠注射SP2/0细胞,以作为阴性对照。每天观察小鼠腹部变化,待其腹部明显胀大时,采集腹水,此过程大约需要10d。采集后对腹水内的细胞进行分离,在超净工作台中无菌进行,使用酒精棉对小鼠的腹部进行消毒,使用10mL的注射器针头进行引流,针头的一端插入小鼠的腹腔,另一端置于15mL离心管上方,收集完成后,1500r/min,离心10min,吸取上清保存备用。使用1640培养基重悬离心管底部的细胞进行清洗,1500r/min,离心10min后,使用3mL的1640培养基重悬细胞,在一个新的15mL的离心管内,加入5mL的淋巴细胞分离液,并沿侧壁慢慢的将重悬后的细胞滴加进去,静置十分钟后取白色分层,即为分离出的细胞,使用1640培养基再次对细胞清洗,1500r/min,离心10min后即为从小鼠淋巴细胞中分离出来的细胞,使用冻存液进行冻存,保存。

[0055] 按照rProtein G Breads 4FF (SA020025)试剂盒说明书(天地人和生物科技有限公司)纯化IgG亚类的单克隆抗体腹水,具体步骤如下,样品准备:腹水经10000r/min,4 $^{\circ}$ C离心20min后,弃去沉淀。上清用滤纸过滤,再与Binding buffer (20mM的磷酸钠溶液,150mM的氯化钠,pH 7.0)按照1:10的比例进行混合,并使用0.45 μ m的滤器过滤;平衡柱子:用ddH₂O对柱子进行清洗,接着在柱子里加入2倍柱体积的Binding buffer;上样:将制备好的样品流经柱子,控制流速在0.2-1mL/min,收集过柱后样品,并反复上样3-5次;洗杂:吸取两倍柱体积的Binding buffer,加入柱子内洗脱未结合的样品。洗脱:在每个1.5mL的离心管中加入100 μ L的抗体纯化中和液,即1M的Tris-HCl (pH 8.5)。吸取12mL的Elution buffer (0.1M的Glycine-HCl, pH 3)洗脱结合在柱子上的IgG亚型的样品,在每个离心管中加入900 μ L洗脱样品,保证边加边中和。纯化结束后,先用ddH₂O对柱子进行清洗,清洗后用20%的乙醇保存柱子,置于4 $^{\circ}$ C保存。使用BCA法以及SDS-PAGE测定纯化后腹水的浓度及纯度。

[0056] 使用rProtein G Breads 4FF纯化IgG类型的腹水,在0.1M的Glycine-HCl (pH 3)的作用下洗脱抗体,并用1M的Tris-HCl (pH 8.5)对抗体进行中和,将获得的抗体置于透析袋中,在4 $^{\circ}$ C条件下使用PBS透析,每隔6h换液,换液3次后收集纯化后的抗体;纯化后的SDS-PAGE结果表明抗体纯度均较高,使用BCA法测得纯化后的浓度均较高,图2、3。

[0057] 表1纯化后单克隆抗体的浓度

	单抗	2C11	4F7	5A8	5B8	5E4
[0058]	浓度 (mg/mL)	3	0.5	2.1	3.4	0.7

[0059] 6. 腹水效价的测定

[0060] 应用间接ELISA方法,使用包被BVDV-1、BVDV-2病毒粒子的ELISA反应板,纯化前的小鼠腹水梯度稀释作为一抗,并做阴性对照,结果表明纯化前2C11、4F7、5A8、5B8的效价可达到 1.024×10^6 ,5E4效价可达到 6.4×10^4 。

[0061] 7. 生物素标记单抗及效价的测定

[0062] 使用生物素快速标记试剂盒(ARL0020K-50K-4.0mL)(福因德科技有限公司),采用生物素法通过伯氨基对单抗进行标记,方法如下,试剂恢复室温后,使用助溶剂DMSO配制10mM活性生物素;根据公式 $V(\mu\text{L}) = [V1(\text{mL}) \times C1(\text{mg/mL}) \times R] / [M \times C(\text{mM})] \times 10^6$,其中V为所需生物素的体积,V1、C1分别为待标记物的体积及浓度,R为生物素与待标记物的分子比例,M为待标记物的分子量,C为生物素的浓度,按照生物素与待标记物的分子比例为1:20,计算出标记2mg的150KDa大小的抗体所需生物素的体积为26.66 μL ;将26.66 μL 的生物素与待标记抗体混合后,避光在37 $^{\circ}\text{C}$ 的温箱孵育30min;孵育后置于超滤管内,4000r/min离心5min后,加入适量的标记缓冲液继续离心,离心数次后浓缩至1mL保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0063] HRP酶标单抗的效价采用直接ELISA法,具体步骤如下,将纯化的BVDV-1、BVDV-2用包被液按照2 $\mu\text{g/mL}$ 加入ELISA板,100 $\mu\text{L/孔}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被。PBST洗板5次,2min/次;加入1%的鱼明胶,200 $\mu\text{L/孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1.5h。PBST洗板5次,2min/次;分别按照1:100、1:200、1:400等进行倍比稀释酶标单抗,100 $\mu\text{L/孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h.,PBST洗板5次,2min/次;加入2万倍稀释的链霉亲和素,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育0.5h,PBST洗板5次,2min/次;使用科前的显色液,分别加入底物A、B液到ELISA板,50 $\mu\text{L/孔}$,避光显色10min后加入终止液,50 $\mu\text{L/孔}$ 。终止后使用OD630nm读数。根据 $P/N > 2.1$ 判断酶标单抗的效价。

[0064] 纯化后2C11、5A8、5B8的效价可达到 1.024×10^5 ,4F7效价可达到 2.56×10^4 ,5E4效价可达到 0.8×10^3 。

[0065] 实施例3:

[0066] 单克隆抗体的生物活性鉴定

[0067] 1. 单克隆抗体的亚类鉴定

[0068] 使用博奥龙BF16002X小鼠单抗Ig类亚类鉴定用酶标二抗(含轻链)(G1\G2a\G2b\G3\M\A\Kappa\Lambda),准备待测杂交瘤细胞株培养上清或用PBST稀释的单抗腹水(一般稀释1000倍)每株待测样本加8孔,作为孵育一抗。将本产品的8种酶标记物二抗,每种加2孔,作为孵育二抗,其余方法同上。结果如表所示,表明有3株杂交瘤细胞株为IgG1/K,2株为Ig2b/K,图4。

[0069] 2. 杂交瘤细胞的染色体计数

[0070] 分别将生长旺盛的5株杂交瘤细胞株进行传代,用秋水仙素进行处理并进行染色体计数,具体步骤如下,将生长旺盛的杂交瘤细胞传代,36-48h后加入秋水仙素,终浓度为0.1-0.5 $\mu\text{g/mL}$,继续培养4-6h后,重悬细胞以1000r/min,离心10min后弃去上清;加入5mL已在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅预热的0.075mol/L KCl重悬细胞,在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅作用15-20min;加入新配制的固定液(甲醇与冰乙酸按照3:1的比例混合)1mL,重悬细胞,1000r/min,离心10min后弃去

上清;再加入5mL固定液将细胞重悬并混匀,室温静置30min,1000r/min,离心10min后弃去上清;重复上述步骤一次,然后加入5mL固定液,将细胞重悬并混匀,4℃放置过夜后,1000r/min,离心10min后弃去上清,保留少许固定液与细胞混匀,吸取1-2滴悬液至冰预冷的载玻片上,酒精灯火焰处干燥;先用姬姆萨A液室温染色1min,接着加3倍体积的姬姆萨B液,用枪头轻轻吹打混匀A、B液,室温染色10min后弃去染液,用蒸馏水洗去残液,放入60℃烘箱快速烘干;使用油镜观察,选择染色体分散良好,无重叠、失散的细胞进行观察并分析,计数。结果表明杂交瘤染色体细胞数均大于100个,为正常脾细胞和骨髓瘤细胞染色体数总和;且杂交瘤细胞株的染色体较多,分散集中、良好,在油镜视野下可见中间着丝点染色体,图6。

[0071] 3. 杂交瘤细胞的稳定传代

[0072] 在体外对杂交瘤细胞进行4次传代,传代后收集细胞培养液上清,使用建立好的间接ELISA方法测定杂交瘤细胞分泌的抗体水平。结果表明5株杂交瘤细胞株在四次亚克隆过程中,能够稳定分泌抗体,并能稳定传代,分别为2C11、4F7、5A8、5B8、5E4。

[0073] 4. 单克隆抗体的Western Blotting鉴定

[0074] 上样BVDV-1、BVDV-2及细胞碎片,进行SDS-PAGE,转膜后单抗以1:500的稀释度作为一抗进行孵育,羊抗鼠二抗以1:10000的稀释度作为二抗孵育,结果如图所示,5株单克隆抗体均能特异地和BVDV-1、BVDV-2反应,而不和细胞碎片反应,图5。

[0075] 5. 单克隆抗体的间接免疫荧光鉴定

[0076] 将MDBK细胞分散平均接种于六孔板细胞培养板,每孔加入2.5mL的培养液,置37℃、含5%二氧化碳的培养箱中培养至致密单层;去掉六孔板中的生长液,用DMEM洗涤3次(将孔板倾斜,从上面冲,下面进行吸干,最后1次将孔中DMEM吸干,注意吸头不用碰到细胞),每孔加入1mL用维持液稀释的病毒液。在最后一列第一孔加入1mL空白的维持液,做空白细胞对照;接种病毒出现70%以上的细胞病变后,用1mL预冷的PBS(0.01mol/L, pH 7.4)洗涤2遍,每孔加入1mL预冷的4%多聚甲醛,室温下固定15min,加入1mL预冷的PBS洗涤,置于水平摇床3min,重复5遍;加1mL的TritonX-100,室温静置10min,吸取上清。加入1mL预冷的PBS洗涤,置于水平摇床3min,重复5遍;每孔加500μL的PBST,作为封闭液,封闭10min,加入1mL预冷的PBS洗涤,置于水平摇床3min,重复5遍;每孔分别加入500μL的待检样品即单克隆抗体,根据检测需要,可用PBS进行500倍稀释,同时设对照:最后一孔加入1mL的PBS,做接毒细胞对照;于37℃培养箱孵育1h。去掉液体,加1mL预冷的PBS洗,置于水平摇床3min,重复5遍。每孔加入500μL的1:100倍稀释的羊抗鼠IgG荧光二抗(FITC标记),于37℃避光孵育1h,加1mL预冷的PBS洗,置于水平摇床3min,重复5遍,最后1次拍干。每孔加入500μL PBS,在倒置荧光显微镜下观察结果,采集图片;分别使用五株单抗以1:500的稀释度作为一抗孵育, FITC标记的羊抗鼠二抗作为二抗孵育,通过荧光显微镜观察,五株单抗均能和接种BVDV-1、BVDV-2病毒的细胞反应,且均不和空白细胞反应,图7、8。

[0077] 6. 单克隆抗体的中和活性鉴定

[0078] 采用终点法中和试验,固定病毒稀释血清,测定单抗是否具有中和活性,具体操作如下,将BVDV阴、阳性血清在56℃水浴中静置30min,去除补体和非特异性杀病毒因子,并用0.22μm的滤器过滤除菌;将单抗、BVDV阴、阳性血清用DMEM分别进行1:5、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320稀释;将病毒(BVDV-1、BVDV-2)稀释成100TCID₅₀;取50μL病毒液与等体积不同稀释度的单抗上清、阴阳性血清混合,充分混匀后,37℃培养箱孵育1h;传代长满单层的

MDBK细胞,加入到96孔板中,100 μ L/孔,将上述病毒和单抗及血清的混合液接种至刚传代的MDBK细胞,同时做如下对照,病毒对照即将病毒液梯度稀释,与等体积最低稀释倍数的上清混合感作后加入;单抗对照即在空白未接毒的细胞加入低倍稀释的单抗,以确定单抗本身对细胞没有毒性作用以及空白细胞对照;3d后接种CP型毒株通过观察各个板孔细胞病变,接种NCP型毒株通过间接免疫荧光实验判断病变,通过是否有病变或荧光判断单抗是否有中和活性。结果表明5株单克隆抗体均没有中和活性。

[0079] 7. 单克隆抗体阻断效果的鉴定

[0080] 使用阻断ELISA的方法判断单克隆抗体是否存在阻断效果,具体步骤如下,将纯化的BVDV-1、BVDV-2用包被液以2 μ g/mL加入ELISA板,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜包被。PBST洗板5次,2min/次;加入1%的鱼明胶,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭1.5h。PBST洗板5次,2min/次;阴、阳性血清的孵育:将已确定的BVDV抗体阴性及阳性血清10倍稀释,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h,PBST洗板5次,2min/次;单抗的孵育:按照1:500、1:1000、1:2000等梯度稀释,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h,PBST洗板5次,2min/次;二抗的孵育:加入1:5000稀释后HRP标记的羊抗鼠二抗,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min,PBST洗板5次,2min/次;使用科前的显色液,分别加入底物A、B液到ELISA板,50 μ L/孔,避光显色10min后加入终止液,50 μ L/孔。终止后使用OD630nm读数。计数阻断率,阻断率=(N-S)/N*100%。结果表明5株单克隆抗体均没有阻断作用。

[0081] 实施例4:

[0082] DAS-ELISA方法的建立及最佳反应条件的确定

[0083] 1. 相加实验

[0084] 按照建立的间接ELISA方法,其中步骤3改为分别将纯化后的两株单抗按照一定的比例稀释,单独作用的孔每孔加入100 μ L稀释后的单抗,100ng/孔,相加作用的孔每孔各加入50 μ L相对应稀释度的两株的单抗,每个孔做两个重复,其余方法同上。记录OD值后并根据下列公式计算AI。 $AI = [(2A1+2/A1+A2-1) \times 100\%]$,式中,A1、A2分别为各株单克隆抗体单独反应后的A值;A1+2为两两组合的混合单克隆抗体反应后的A值;AI>10%表示两株单克隆抗体细胞株针对不同的抗原表位,具有相加效应;AI<10%则表示两株单克隆抗体细胞株针对的抗原表位相同或相近。(AI=2*A1+2/(A1+A2)-1)相加实验结果表明,2C11和5A8的AI值最大,AI值达到了87%,表明两者可能不处于同一个抗原表位,可用于DAS-ELISA的建立。

[0085] 因此,申请人将可分泌生产2C11和5A8单抗的杂交瘤细胞于2023年05月24日送至中国典型培养物保藏中心保藏,单抗2C11对应的杂交瘤细胞的分类命名为:杂交瘤细胞株(Hybridoma cell line)2C11,保藏编号为:CCTCC NO:C2023120;单抗5A8对应的杂交瘤细胞的分类命名为:杂交瘤细胞株(Hybridoma cell line)5A8,保藏编号为:CCTCC NO:C2023128。

[0086] 2. DAS-ELISA最佳反应条件的确定

[0087] 根据相加实验结果,确定不处于同一个抗原表位的两个单抗,分别作为捕获抗体和检测抗体,做方阵滴定实验,具体步骤如下,将纯化的单克隆抗体用包被液按照8 μ g/mL、4 μ g/mL、2 μ g/mL、1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.25 μ g/mL梯度稀释,按100 μ L/孔加入ELISA板,4 $^{\circ}$ C过夜包被。PBST洗板5次,2min/次;加入板稳定剂进行封闭,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭1.5h。PBST洗板5次,2min/次;将BVDV-1、BVDV-2病毒原液及阴性对照加入ELISA板中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C培养箱孵育45min。PBST洗板5次,2min/次;将生物素标记的单克隆抗体使用酶稳定剂进行稀释,按

照1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000梯度稀释加入ELISA板,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C培养箱孵育30min。PBST洗板5次,2min/次;将链霉亲和素按照1:20000倍用酶稳定剂进行稀释,加入ELISA板中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C培养箱孵育30min。PBST洗板5次,2min/次;结果判定:使用科前的显色液,分别加入底物A、B液到ELISA板,50 μ L/孔,避光显色10min后加入终止液,50 μ L/孔。终止后使用OD630nm读数。取当阳性对照的OD值在1左右,阳性对照/阴性对照的值最大时的包被抗体稀释度和检测抗体稀释度,用于建立DAS-ELISA的诊断方法。

[0088] 其余方法同上,每次改变一个变量,确定DAS-ELISA中最佳封闭时间、抗原孵育时间、检测抗体孵育时间以及显色时间。

[0089] 确定了2C11作为捕获抗体,包被浓度为4 μ g/mL,酶标的5A8作为检测抗体,稀释浓度为2.1 μ g/mL,封闭1h,抗原以及检测抗体孵育时间均为45min以及显色时间为10min。

[0090] 实施例5:DAS-ELISA方法的验证

[0091] 1.DAS-ELISA阴、阳性血清临界值的判断

[0092] 使用建立的DAS-ELISA方法与实时荧光定量法(qPCR),分别检测92份临床牛血清以及81份临床牛粪便的OD值;同时设立阴、阳性对照,并作三个重复,根据 $S/P = (\text{检测样品的OD值} -$

[0093] 阴性对照的OD值) / (阳性对照OD值 - 阴性对照OD值),计算S/P的平均值(\bar{X})及标准差(S

[0094] D),分别计算出粪便样品以及血清样品中 $\bar{X} + 3SD$ 作为阴、阳性判断的临界值;即当检测样品的OD值大于或等于临界值时,判断为阳性,当检测样品的OD值小于临界值时,判断为阴性。

[0095] 经qPCR鉴定,92份临床牛血清中35份血清检测为阳性,57份血清检测为阴性;使用建立的DAS-ELISA方法,测定92份临床牛血清的OD值;根据qPCR的结果,确定阴性血清样品的OD

[0096] 值,并计算出阴性样品的S/P值;据S/P值计算S/P的 \bar{X} 及SD分别为0.146和0.027,得出 $\bar{X} + 3SD$ 为0.228;为减少检测中的假阳性及假阴性,分别在确定的临界值基础上加减一个标准差作为可疑范围;即检测样品为血清样品时,结果判定标准为, $S/P \geq 0.255$ 为阳性, $S/P < 0.101$ 为阴性, $0.101 \leq S/P < 0.255$ 判为可疑,对可疑样品重新检测,若 $S/P \geq 0.228$ 为阳性,反之为阴性。

[0097] 经qPCR鉴定,81份临床牛粪便中35份血清检测为阳性,47份粪便检测为阴性;使用建立的DAS-ELISA方法,测定82份临床牛粪便的OD值;根据qPCR的结果,确定阴性粪便样品的OD

[0098] 值,并计算出阴性样品的S/P值;据S/P值计算S/P的 \bar{X} 及SD分别为0.017和0.038,以 $\bar{X} \pm 3SD$ 为阳性临界值即0.131;为减少检测中的假阳性及假阴性,分别在确定的临界值基础上加减一个标准差作为可疑范围;即检测样品为粪便样品时,结果判定标准为, $S/P \geq 0.169$ 为阳性, $S/P < 0.093$ 为阴性, $0.093 \leq S/P < 0.169$ 判为可疑,对可疑样品重新检测,若 $S/P \geq 0.131$ 为阳性,反之为阴性。

[0099] 2.DAS-ELISA的分析敏感性判定

[0100] 使用建立的DAS-ELISA对梯度稀释的病毒及阴性样品检测,结果如表所示,根据阴性临界值判断,当 10^5 TCID₅₀/mL的BVDV-1、BVDV-2病毒稀释10倍后,OD值判断仍为阳性,表明该检测方法最低可以检测到 10^4 个TCID₅₀的病毒量。具体结果见表1。

[0101] 表2DAS-ELISA的分析灵敏性

[0102]		1: 1	1: 3	1: 10	1: 30	1: 100	1: 300
	BVDV-1	1.046	0.479	0.241	0.237	0.183	0.170
[0103]	BVDV-2	1.034	0.501	0.284	0.203	0.181	0.165
	阴性对照	0.193	0.152	0.147	0.133	0.137	0.116

[0104] 3.DAS-ELISA的重复性实验

[0105] 使用同一批次包被的酶标板,分别检测8份BVDV的阴、阳性样品,每份样品做8个重复;按照建立的DAS-ELISA的方法进行检测,根据检测样品的OD值计算检测样品的平均值、标准差和变异系数;结果如表所示,表明用同一批次包被的酶标板检测BVDV的阴、阳性样品,变异系数均小于10%,表明建立的DAS-ELISA检测方法批内重复性较好。

[0106] 使用四个不同批次包被的酶标板,分别检测8份BVDV的阴、阳性样品,;按照建立的DAS-ELISA的方法进行检测,根据检测样品的OD值计算检测样品的平均值、标准差和变异系数;结果如表2所示,表明用不同一批次包被的酶标板检测BVDV的阴、阳性样品,变异系数均小于10%,表明建立的DAS-ELISA检测方法批内重复性较好。

[0107] 表3DAS-ELISA批内及批间重复性实验

[0108]	样品	批内重复性实验检测		批间重复性实验检测	
		$\bar{X} \pm SD$	CV/%	$\bar{X} \pm SD$	CV/%
	P1	0.862±0.027	3.1	0.917±0.059	6.4
	P2	0.941±0.019	2	0.940±0.051	5.4
	P3	1.002±0.027	2.7	0.997±0.060	6.0
	P4	1.087±0.078	7.1	1.105±0.080	7
	N1	0.117±0.008	6.8	0.230±0.016	6.9
	N2	0.169±0.011	6.5	0.209±0.020	9.5
	N3	0.194±0.005	2.6	0.195±0.017	8.7
	N4	0.175±0.017	9.7	0.214±0.021	9.8

[0109] 4.DAS-ELISA的特异性实验

[0110] 使用DAS-ELISA分别检测几种实验室常见的病毒包括IBRV、BPIV-3以及BVDV的其他基因型,结果表明该方法只特异的与BVDV反应,不和其他的病毒交叉反应,表明建立的该方法特异性较好,图9。

[0111] 5.DAS-ELISA的诊断特异性、诊断敏感性及符合率

[0112] 使用建立的DAS-ELISA与国际标准qPCP相比,检测53份临床牛血清样品。结果如表3所示,DAS-ELISA的检测结果为阳性37份、阴性16份,qPCP的检测结果为阳性38份、阴性15

份,本研究建立的DAS-ELISA方法与qPCP的诊断敏感性为83.3% (95%CI:69.2%-92.0%)、诊断特异性为86.7% (95%CI:58.3%-97.8%)及符合率为84.1% (95%CI:69.0%-93.8%)。

[0113] 使用建立的DAS-ELISA与国际标准qPCP相比,检测40份临床粪便样品。结果如表4所示,DAS-ELISA的检测结果为阳性16份、阴性24份,qPCP的检测结果为阳性17份、阴性23份,本研究建立的DAS-ELISA方法与qPCP的诊断敏感性为82.4% (95%CI:55.8%-95.4%)、诊断特异性为91.3% (95%CI:70.5%-98.5%)及符合率为87.5% (95%CI:73.2%-95.8%)。

[0114] 表4DAS-ELISA与qPCR平行检测血清样品的结果

		qPCR			
		N	P	Total	
[0115]	DAS-ELISA (血清)	P	2	35	37
		N	13	3	16
		Total	15	38	53

[0116] 注:P代表阳性样品份数,N代表阴性样品份数

[0117] 表5DAS-ELISA与qPCR平行检测粪便样品的结果

		qPCR			
		N	P	Total	
[0118]	DAS-ELISA (粪便)	P	2	14	16
		N	21	3	24
		Total	23	17	40

[0119] 注:P代表阳性样品份数,N代表阴性样品份数

[0120] 6.DAS-ELISA的保存期实验

[0121] 使用同一批次包被的DAS-ELISA反应板,分别在37℃高温条件下放置1、3、5、7d后检测阴、阳性样品;高温破坏实验结果如表5所示,BVDV阳性对照、阴性对照的3个重复的差值均小于0.2,表明制备的DAS-ELISA可以在37℃高温条件下保存7d。

[0122] 表6DAS-ELISA的保存期确定

		保存天数	1d	3d	5d	7d
[0123]	37℃	阳性对照	0.819	0.743	0.747	0.823
		阴性对照	0.193	0.147	0.127	0.153
	4℃	阳性对照	0.827	0.809	0.839	0.821
		阴性对照	0.197	0.176	0.188	0.179

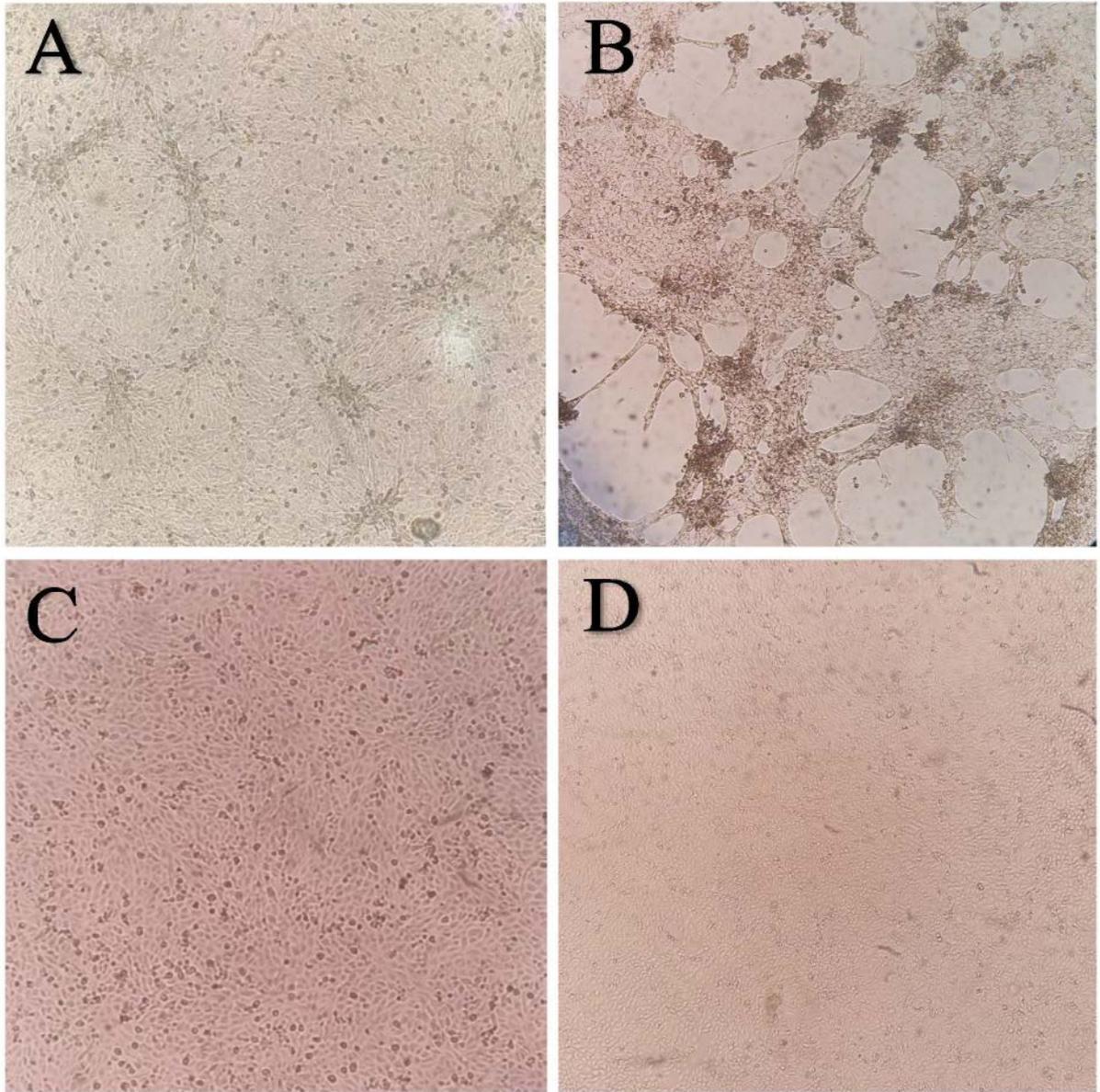


图1

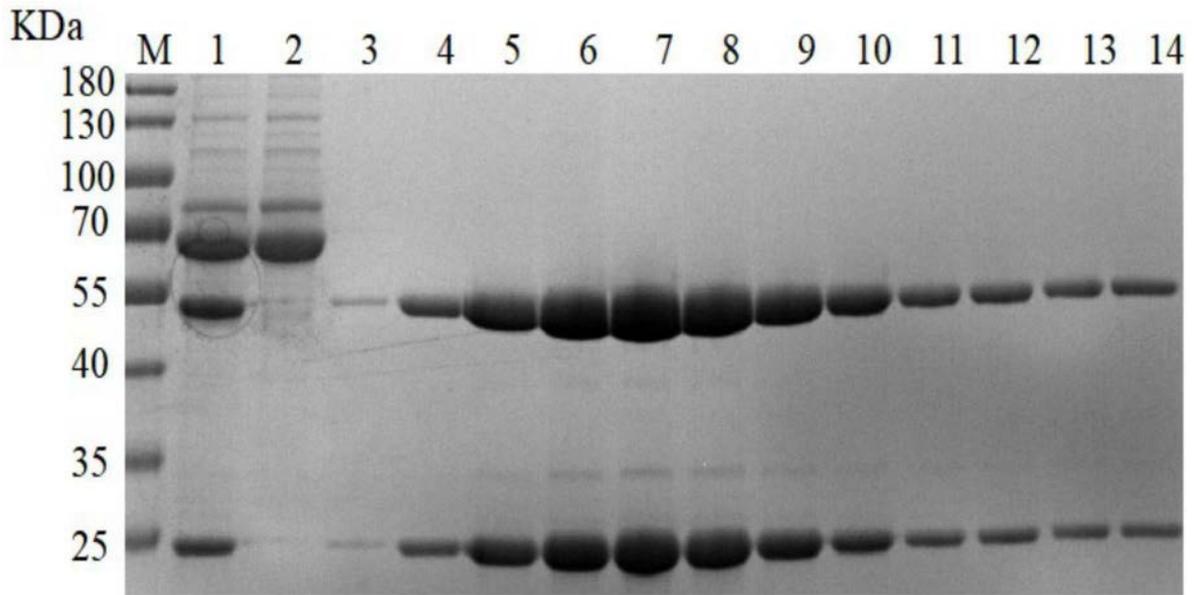


图2

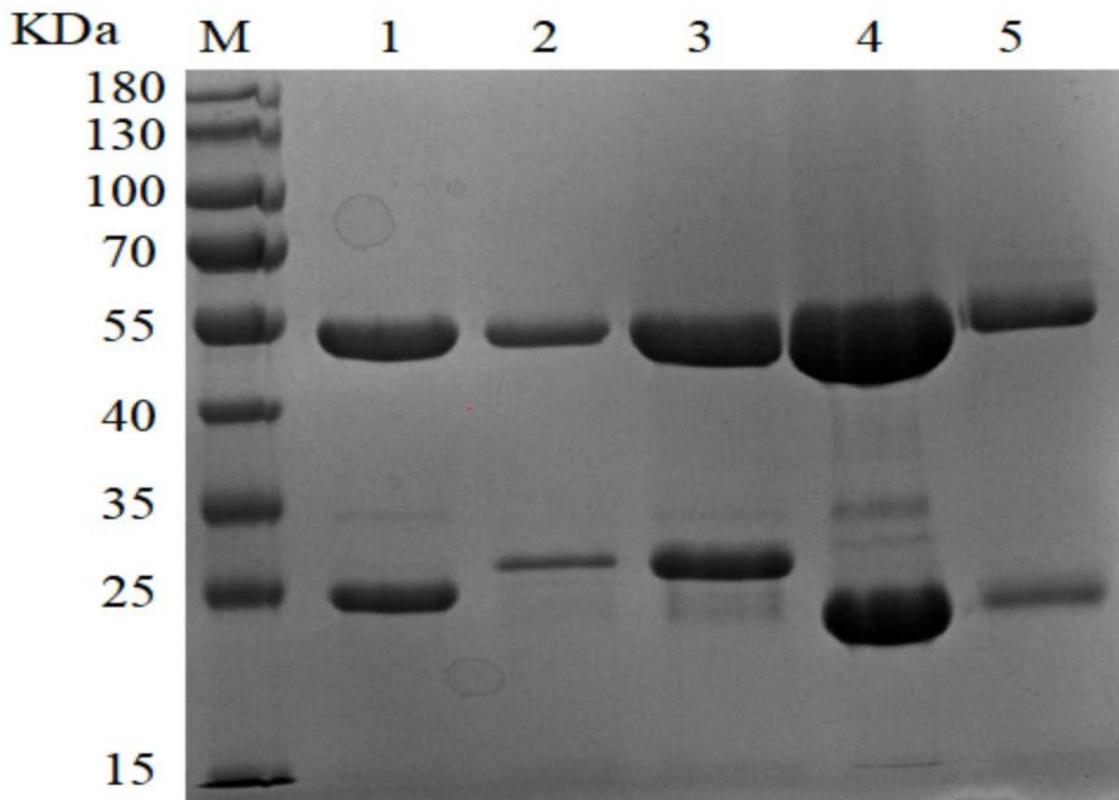


图3

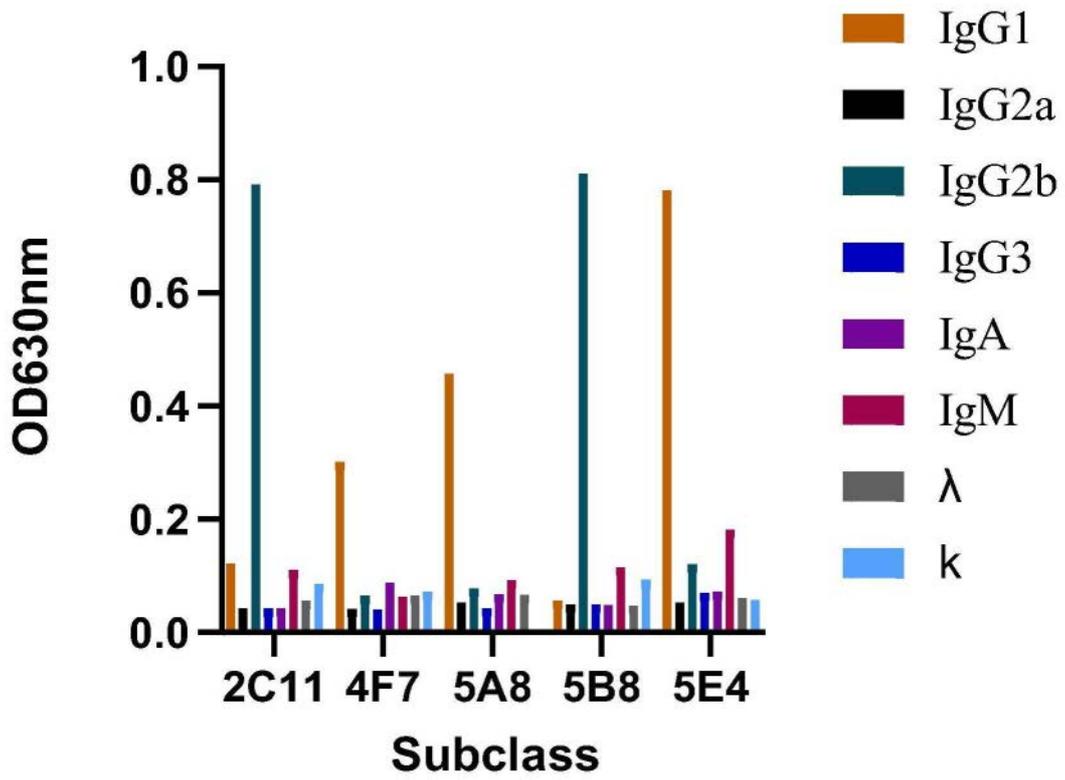


图4

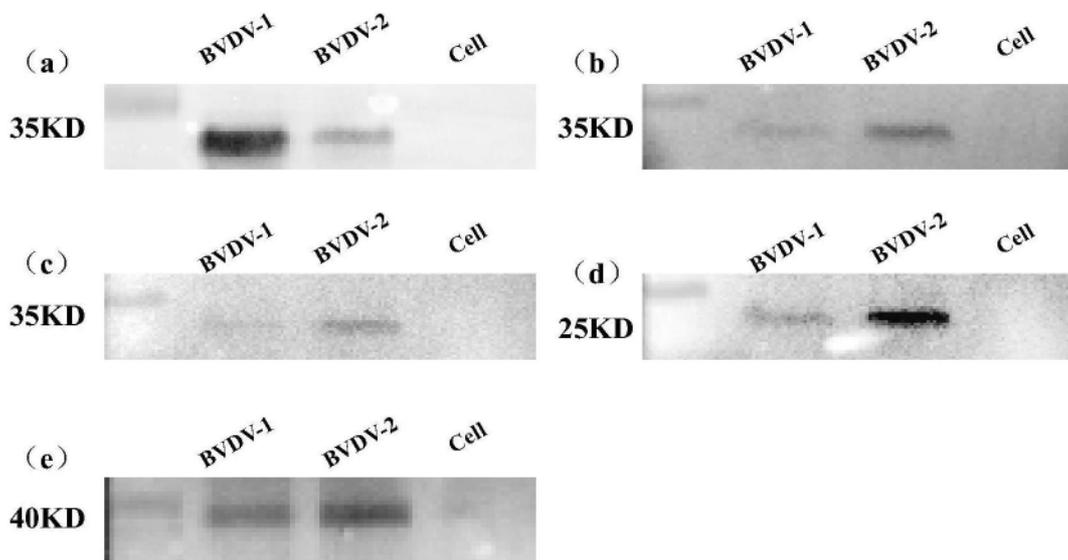


图5

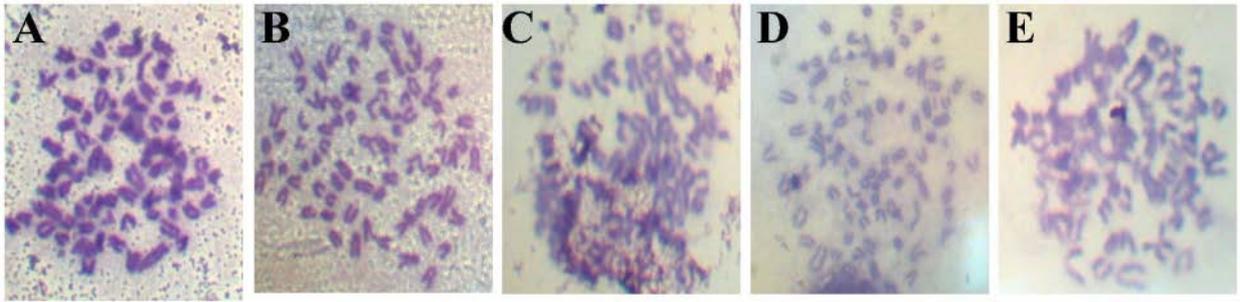


图6

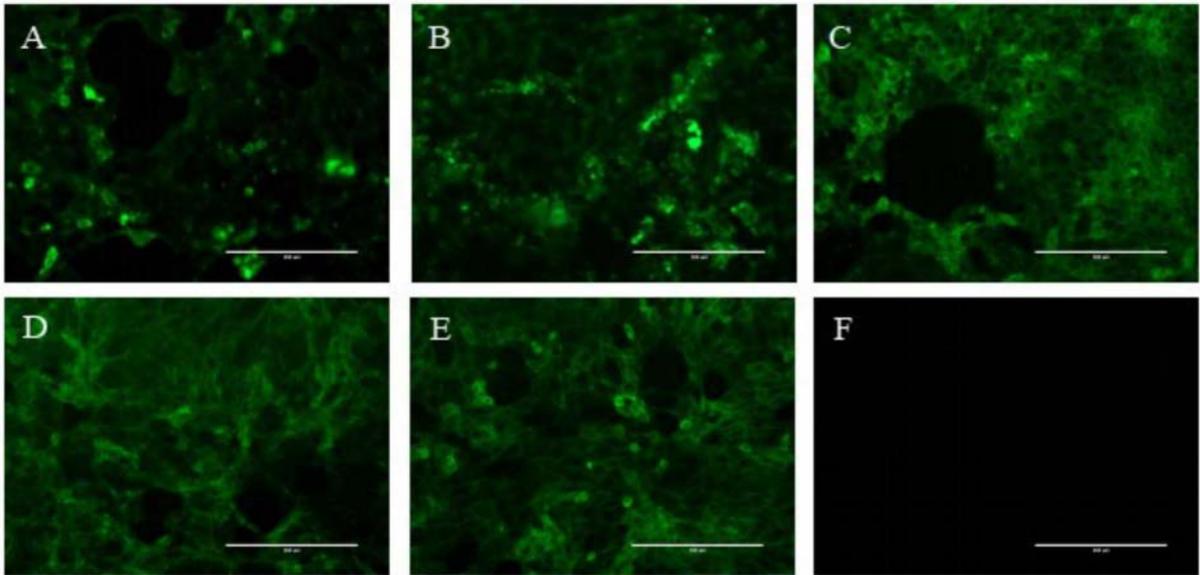


图7

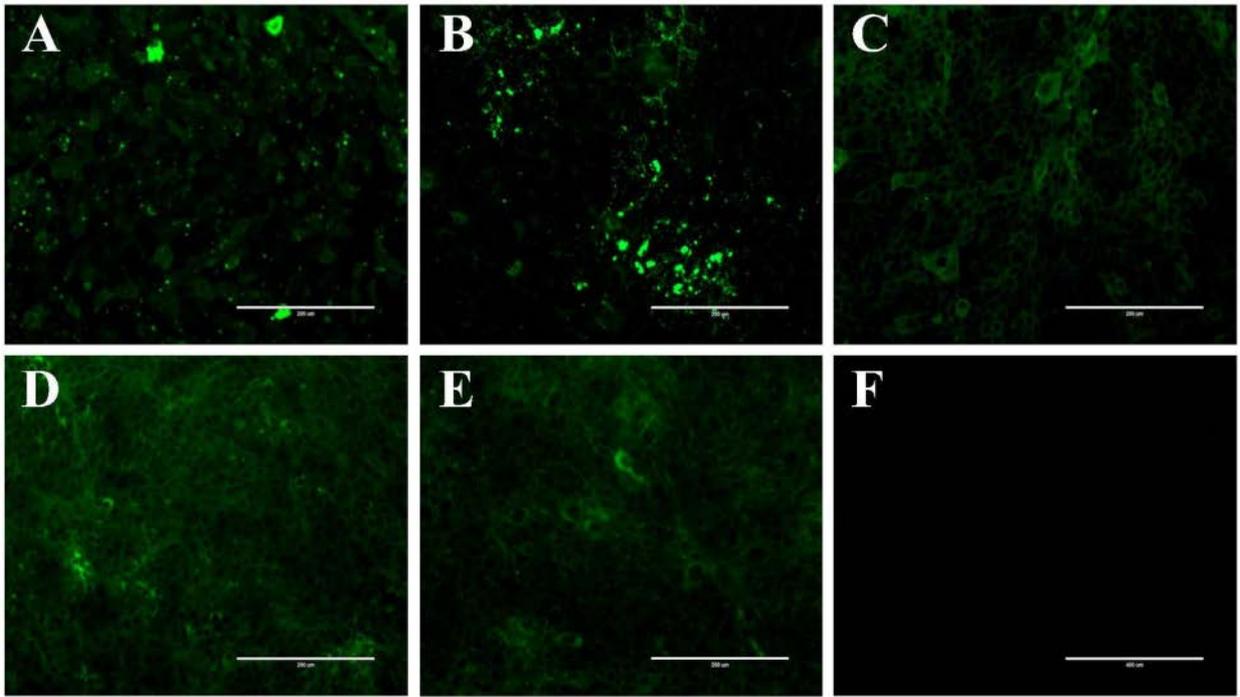


图8

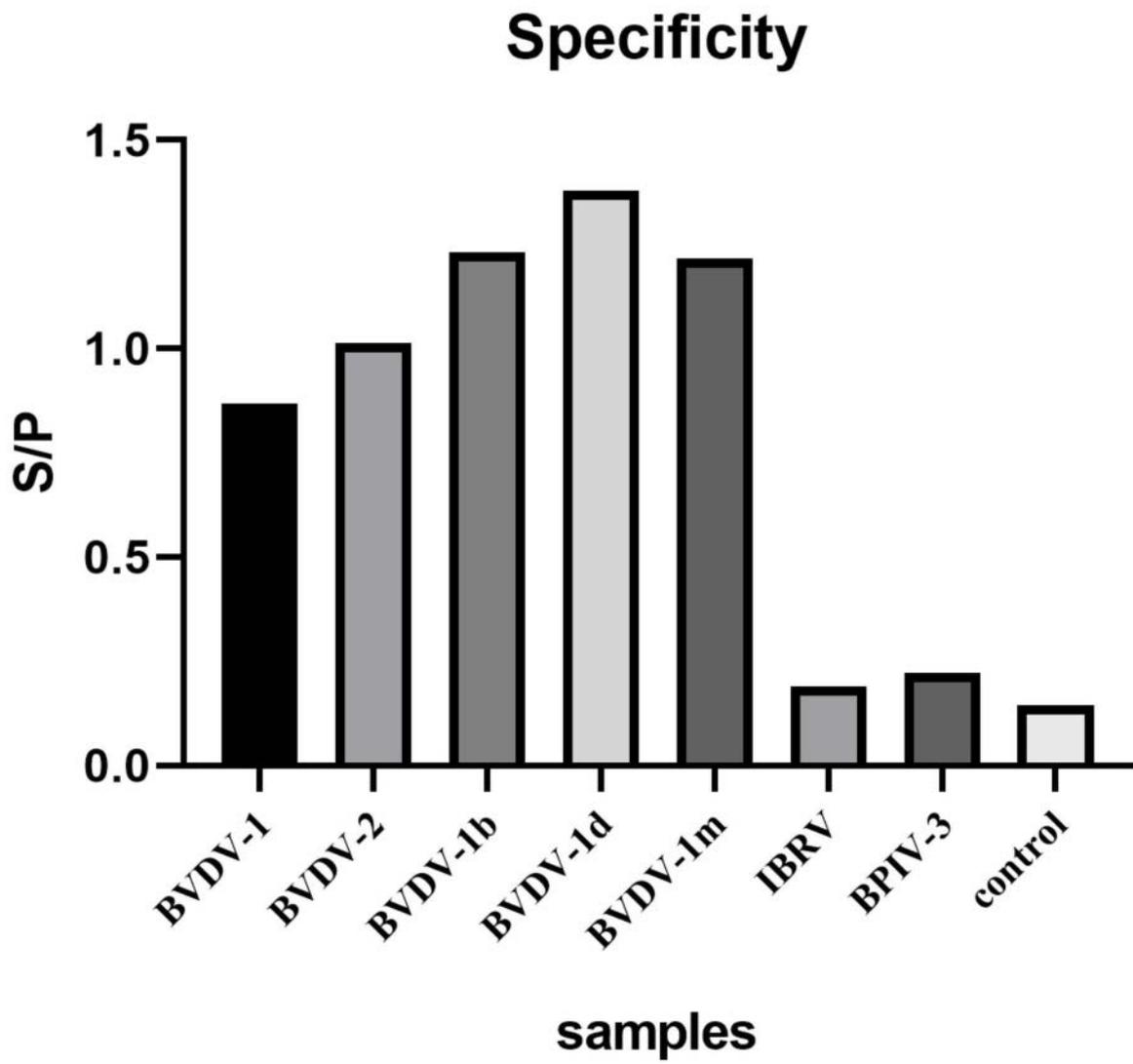


图9