



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116462767 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 21

(21) 申请号 202310502100.3

G01N 33/569 (2006.01)

(22) 申请日 2023.05.06

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

(71) 申请人 领地动物诊疗科技(厦门)有限公司

地址 361000 福建省厦门市海沧区翁角西路2076号厦门生物医药产业园B14号楼第9层01-2单元

申请人 厦门同仁心生物技术有限公司

(72) 发明人 张涛 林奕婷 邹柳 周国栋

盛布恩 张松

(74) 专利代理机构 厦门荔信律和知识产权代理

有限公司 35282

专利代理师 赖秀华

(51) Int. Cl.

G07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

权利要求书2页 说明书16页

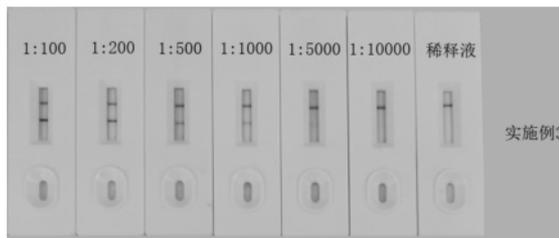
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对、核酸分子、胶体金试纸、试剂盒和应用

(57) 摘要

本发明属于免疫学领域和分子病毒学的技术领域,公开了抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对、核酸分子、胶体金试纸、试剂盒和应用。在抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段包括第一抗体和第二抗体;第一抗体的重链可变区包括氨基酸序列如SEQ ID NO:1~3所示的互补决定区1~3,轻链可变区包括氨基酸序列如SEQ ID NO:4~6所示的互补决定区1~3;第二抗体的重链可变区包括氨基酸序列如SEQ ID NO:7~9所示的互补决定区1~3,轻链可变区包括氨基酸序列如SEQ ID NO:10~12所示的互补决定区1~3。本发明的抗体对特异性识别多种猫杯状病毒的变异毒株,不与引起猫常见临床疾病其他病毒发生阳性反应,表现出优秀的特异性和灵敏度,可用于建立快速、精确检测猫杯状病毒的方法。



1. 一种抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段,其特征在于,包括第一抗体和第二抗体;

所述第一抗体的重链可变区包括氨基酸序列如SEQ ID NO:1~3所示的互补决定区1~3,轻链可变区包括氨基酸序列如SEQ ID NO:4~6所示的互补决定区1~3;

所述第二抗体的重链可变区包括氨基酸序列如SEQ ID NO:7~9所示的互补决定区1~3,轻链可变区包括氨基酸序列如SEQ ID NO:10~12所示的互补决定区1~3。

2. 根据权利要求1所述的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段,其特征在于,所述第一抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示或者是与SEQ ID NO:13所示序列具有至少80%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示或者是与SEQ ID NO:14所示序列具有至少80%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列;

所述第二抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示或者是与SEQ ID NO:15所示序列具有至少80%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示或者是与SEQ ID NO:16所示序列具有至少80%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列。

3. 根据权利要求1所述的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段,其特征在于,所述第一抗体的重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示或者是与SEQ ID NO:17所示序列具有至少70%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示或者是与SEQ ID NO:18所示序列具有至少70%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列;

所述第二抗体的重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示或者是与SEQ ID NO:19所示序列具有至少70%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示或者是与SEQ ID NO:20所示序列具有至少70%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列。

4. 根据权利要求1所述的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段,其特征在于,所述第一抗体上还包含有可检测的标记,所述可检测的标记选自放射性同位素、荧光染料、生物素、胶体金和酶中的一种或多种;

任选地,所述第二抗体上还包含有可检测的标记,所述可检测的标记选自放射性同位素、荧光染料、生物素、胶体金和酶中的一种或多种。

5. 一种核酸分子,其特征在于,编码权利要求1~4任一所述的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段。

6. 根据权利要求5所述的核酸分子,其特征在于,所述核酸分子包括序列如SEQ ID NO:21~24所示的核苷酸片段中的一段或多段,或者是与SEQ ID NO:21~24所示序列完全互补或在中度至高度严格条件下杂交的核苷酸片段中的一段或多段。

7. 一种胶体金试纸,其特征在于,包括权利要求1~4任一所述的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段。

8. 根据权利要求7所述的胶体金试纸,其特征在于,所述第一抗体为捕获抗体,所述第二抗体为标记抗体。

9. 一种用于检测猫杯状病毒的试剂盒,其特征在于,包括权利要求1~4任一所述的抗

猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段、权利要求5或6所述的核酸分子和/或权利要求7或8所述的胶体金试纸。

10. 权利要求1~4任一所述的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段、权利要求5或6所述的核酸分子、权利要求7或8所述的胶体金试纸和/或权利要求9所述的试剂盒在猫杯状病毒或其衣壳蛋白的定性和定量检测中的应用。

抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对、核酸分子、胶体金试纸、试剂盒和应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学领域和分子病毒学的技术领域,尤其涉及一种抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对、核酸分子、胶体金试纸、试剂盒和应用。

背景技术

[0002] 猫杯状病毒属于杯状病毒科水疱性病毒属,是一种线性单股正链RNA病毒,病毒粒子外观呈对称多边形,结构紧凑,具有稳定的理化性质。猫杯状病毒对于猫科动物具有高传染性,病毒感染后可引起猫科动物上呼吸道感染、慢性肠胃炎以及口腔溃疡等疾病,严重的可引起严重、急性、致死性全身性的疾病,死亡率高达50%,对于猫及猫科动物造成了严重的影响。

[0003] 目前,用于猫杯状病毒常规的检测方法有病毒分离鉴定、中和试验、RT-PCR以及胶体金试纸法等。但是,病毒分离及中和试验的检测所需时间长;RT-PCR虽然灵敏度高,但是结果容易受到外界因素的影响;而胶体金试纸法受到所使用到的抗体质量的影响,检测灵敏度和特异性较低,检测结果容易出现假阳性和假阴性。

发明内容

[0004] 为了提高对猫杯状病毒检测的敏感性和特异性,并建立快速检测猫杯状病毒的方法,本发明提供了一种抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对、核酸分子、胶体金试纸、试剂盒和应用。

[0005] 第一方面,本发明提供的一种抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段采用以下的技术方案:

[0006] 一种抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段,包括第一抗体和第二抗体;

[0007] 所述第一抗体的重链可变区包括氨基酸序列如SEQ ID NO:1~3所示的互补决定区1~3,轻链可变区包括氨基酸序列如SEQ ID NO:4~6所示的互补决定区1~3;

[0008] 所述第二抗体的重链可变区包括氨基酸序列如SEQ ID NO:7~9所示的互补决定区1~3,轻链可变区包括氨基酸序列如SEQ ID NO:10~12所示的互补决定区1~3。

[0009] 在一些具体的实施方式中,所述第一抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示或者是与SEQ ID NO:13所示序列具有至少80%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示或者是与SEQ ID NO:14所示序列具有至少80%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列;

[0010] 所述第二抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示或者是与SEQ ID NO:15所示序列具有至少80%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示或者是与SEQ ID NO:16所示序列具有至少80%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列。

[0011] 在一些具体的实施方式中,所述第一抗体的重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示或者是与SEQ ID NO:17所示序列具有至少70%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示或者是与SEQ ID NO:18所示序列具有至少70%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列;

[0012] 所述第二抗体的重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示或者是与SEQ ID NO:19所示序列具有至少70%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示或者是与SEQ ID NO:20所示序列具有至少70%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列。

[0013] 在一些具体的实施方式中,所述第一抗体上还包含有可检测的标记,所述可检测的标记选自放射性同位素、荧光染料、生物素、胶体金和酶中的一种或多种。

[0014] 在一些具体的实施方式中,所述第二抗体上还包含有可检测的标记,所述可检测的标记选自放射性同位素、荧光染料、生物素、胶体金和酶中的一种或多种

[0015] 第二方面,本发明提供了一种核酸分子采用以下的技术方案:

[0016] 一种核酸分子,编码上述抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段。

[0017] 在一些具体的实施方式中,所述核酸分子包括序列如SEQ ID NO:21~24所示的核苷酸片段中的一段或多段,或者是与SEQ ID NO:21~24所示序列完全互补或在中度至高度严格条件下杂交的核苷酸片段中的一段或多段。

[0018] 第三方面,本发明提供了一种胶体金试纸采用以下的技术方案:

[0019] 一种胶体金试纸,包括上述的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段。

[0020] 在一些具体的实施方式中,所述第一抗体为捕获抗体,所述第二抗体为标记抗体。

[0021] 第四方面,本发明提供了一种试剂盒采用以下的技术方案:

[0022] 一种用于检测猫杯状病毒的试剂盒,包括上述抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段、上述核酸分子和/或上述胶体金试纸。

[0023] 第五方面,本发明提供了上述抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段、核酸分子、胶体金试纸和/或试剂盒在猫杯状病毒或其衣壳蛋白的定性和定量检测中的应用。

[0024] 有益效果:

[0025] 本发明提供的抗体对与猫杯状病毒具有良好的结合能力,将其应用于猫杯状病毒或其衣壳蛋白的检测中时,该抗体对能特异性识别多种猫杯状病毒的变异毒株,且与引起猫常见临床疾病其他病毒不发生阳性反应,表现出优秀的特异性和灵敏度,可作为胶体金试纸中的检测抗体和捕获抗体使用,从而建立快速检测猫杯状病毒的方法,对于预防和控制猫杯状病毒流行具有重要意义。

附图说明

[0026] 图1为本发明实施例5中实施例3提供的胶体金试纸的检测敏感度实验结果图;

[0027] 图2为本发明实施例5中实施例4提供的胶体金试纸的检测敏感度实验结果图;

[0028] 图3为本发明实施例5中对照组提供的胶体金试纸的检测敏感度实验结果图;

[0029] 图4为本发明实施例6中实施例3提供的胶体金试纸的检测特异性实验结果图;

[0030] 图5为本发明实施例6中实施例4提供的胶体金试纸的检测特异性实验结果图;

- [0031] 图6为本发明实施例6中对照组提供的胶体金试纸的检测特异性实验结果图；
- [0032] 图7为本发明实施例7中抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体或其抗原结合片段的稳定性实验结果图(初始)；
- [0033] 图8为本发明实施例7中抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体或其抗原结合片段的稳定性实验结果图(45℃下放置1个月)；
- [0034] 图9为本发明实施例7中抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体或其抗原结合片段的稳定性实验结果图(45℃下放置2个月)；
- [0035] 图10为本发明实施例7中抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体或其抗原结合片段的稳定性实验结果图(45℃下放置3个月)；
- [0036] 图11为本发明实施例7中抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体或其抗原结合片段的稳定性实验结果图(45℃下放置4个月)；
- [0037] 图12为本发明实施例7中抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体或其抗原结合片段的稳定性实验结果图(45℃下放置5个月)。

具体实施方式

- [0038] 本发明中所涉及的氨基酸序列和核苷酸序列如表7所示。
- [0039] 表7.

[0040]

名称	编号	序列信息
5G2 抗体 VH CDR1	SEQ ID NO:1	GFTSFRNQYGV
5G2 抗体 VH CDR2	SEQ ID NO:2	INSGGSST
5G2 抗体 VH CDR3	SEQ ID NO:3	ARLHVFP LNY
5G2 抗体 VL CDR1	SEQ ID NO:4	QSLANSYTYA
5G2 抗体 VL CDR2	SEQ ID NO:5	FAS
5G2 抗体 VL CDR3	SEQ ID NO:6	QQGFDNYTPFT
9C4 抗体 VH CDR1	SEQ ID NO:7	GFSLSTSSMYS
9C4 抗体 VH CDR2	SEQ ID NO:8	IWWDDDK
9C4 抗体 VH CDR3	SEQ ID NO:9	TRISHGSFLGFSY
9C4 抗体 VL CDR1	SEQ ID NO:10	QSLSWSVNTNNQ
9C4 抗体 VL CDR2	SEQ ID NO:11	GAS
9C4 抗体 VL CDR3	SEQ ID NO:12	QHEGYGKPFT
5G2 抗体 VH	SEQ ID NO:13	EVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFTSFRNQYGVMSWQR CTPTRRTEWLATINSGGSSTFY PDSVKGRFFLARFSTRAKST LYLQMSSLQSDDTAMY YCARLHVFP LNYWGQGTTLTVSS
5G2 抗体 VL	SEQ ID NO:14	DIVLTQSPSSLAVSLGQRATISCRASQSLANSYTYALAWAQ YKPGCSPQLQIYFASTRESGVPGESESTIGTDFTLTIQAEDLAD YFCQQGFDNYTPFTFGSGTKLEIK
9C4 抗体 VH	SEQ ID NO:15	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLSTSSMYSVAWLRI PSGKQLEWWAHIWDDDKRYNPALSRDRFIGGDTSSNQA FLKSNADTATYYCTRISHGSFLGFSYWGQGLTVSA
9C4 抗体 VL	SEQ ID NO:16	DIVMTQSPASLAVALGQRATISCKSSQSLSWSVNTNNQLSW YPQKQCQPQKLG IYGASIRESWVPDRFTGGSKSRLTISK TIN VIASVDLAVYYCQHEGYGKPFT
5G2 抗体 CH	SEQ ID NO:17	AKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVT LGCLVKGYFPEPVTVT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTC NVAHPASSTKV DKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKP KDVLTITLTPKVT CVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQ TQPREEQFNSTFRSVSELPI MHQDWLNGKEFKCRVNSAAFP APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITD FPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
5G2 抗体 CL	SEQ ID NO:18	RADAAPT VSIFFPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKW KIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN RNEC
9C4 抗体 CH	SEQ ID NO:19	AKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVT LGCLVKGYFPEPVTVT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTC NVAHPASSTKV DKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKP

[0041]

		KDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQ TQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFP APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITD FFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
9C4 抗体 CL	SEQ ID NO:20	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKW KIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCETHKTSSTSPIVKSFNRENC
5G2 抗体 ntVH	SEQ ID NO:21	GAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCCCGGCCTGGTGGC CCCCAGCCAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGG CTTACCAGCTTACAGGAACAGTACGGCGTGATGAGCTG GCAGAGGTGCACCCACCAGGAGGACCGAGTGGCTGG CCACCATCAACAGCGGCGGCAGCAGCACCTTCTACCCCG ACAGCGTGAAGGGCAGGTTCTTCTGGCCAGGTTACAGCA CCAGGGCCAAGAGCACCCCTGTACCTGCAGATGAGCAGCC TGCAGAGCGACGACACCGCCATGTACTACTGCGCCAGGC TGCACGTGTTCCCCCTGAACTACTGGGGCCAGGGCACCA CCCTGACCGTGAGCAGC
5G2 抗体 ntVL	SEQ ID NO:22	GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGGCCGTG AGCCTGGGCCAGAGGGCCACCATCAGCTGCAGGGCCAG CCAGAGCCTGGCCAACAGCTACACCTACGCCCTGGCCTG GGCCCAGTACAAGCCCGGCTGCAGCCCCAGCTGCAGAT CTACTTCGCCAGCACAGGGAGAGCGGCGTGCCCGGCAG CGAGAGCACCATCGGCACCGACTTACCCTGACCATCCA GGCCGAGGACCTGGCCGACTACTTCTGCCAGCAGGGCTT CGACAACACTACCCCCCTTACCTTCGGCAGCGGCACCAA GCTGGAGATCAAG
9C4 抗体 ntVH	SEQ ID NO:23	CAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCCCGGCCTGGTGGC CCCCAGCCAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGG CTTCAGCCTGAGCACCAGCAGCATGTACAGCGTGGCCTG GCTGAGGATCCCCAGCGGCAAGCAGCTGGAGTGGTGGG CCCACATCTGGTGGGACGACGACAAGAGGTACAACCCCG CCCTGAGCAGGGACAGGTTTCATCGGCGGCGACACCAGCA GCAACCAGGCCTTCTGAAGAGCAACGCCGACACCGCCA CCTACTACTGCACCAAGGATCAGCCACGGCAGCTTCTGG GCTTCAGTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGA GCGCC
9C4 抗体 ntVL	SEQ ID NO:24	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCAGCCTGGCCGTG GCCCTGGGCCAGAGGGCCACCATCAGCTGCAAGAGCAG CCAGAGCCTGAGCTGGAGCGTGAACACCAACAACCAGCT GAGCTGGTACCCCCAGAAGCAGTGCCAGCCCCAGAAGCT GGGCATCTACGGCGCCAGCATCAGGGAGAGCTGGGTGCC CGACAGGTTACCGGCGGCAGCAAGAGCAGGCTGACCA TCAGCAAGACCATCAACGTGATCGCCAGCGTGGACCTGG CCGTGTACTACTGCCAGCACGAGGGCTACGGCAAGCCCT TCACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAGTTCG

[0042]	重组猫杯状衣壳蛋白	SEQ ID NO:25	<p>GCGGCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAG</p> <p>DDGSITAPEQGTVVGGVIAEPSSQMSTAADMASGKSVDSE WEAFFSFHTSVNWSTSETQGKILFKQSLGPLLNPLYLEHLSKL YVAWSGSVEVRFSSISGSGVFGGKLAIVVPPGVDPIQSTSM LQYPHVLFDARQVEPVIFITPDLRSTLYHLMSTDTTSLVIM VYNDLINPYANDSNSSGCIVTVETKPGSDFKFHLLKPPGSM LTHGSVPSDLIPKTSSLWIGNRFWSDITDFVIRPFVQANRHF DFNQETAGWSTPRFRPITVTISEKNGAKLGVGVATDFIVPGI PDGWPDTTIGEKLVPAGDYAITNGSGNDITTANQYDAADII RNNTNFKGMYICGSLQRAWGDKKISNTAFITTATVEGNDLI PSNVIDQTKIAIFQDNHVQDEVQTSDDTLALLGYTGIGEEAI GANRERVVRISTLPETGARGGNHPIFYKNSIKLGYVIRSIDVF NSQILHTSRQLSLNHYLLPPDSFAVYRIIDSNNGSWFDVGDIF DGFSFVGVSDVVGKLEFPLTASYMGIQLAKIRLASNIRSTMTK L</p>
--------	-----------	--------------	--

[0043] 猫杯状病毒基因组主要包含ORF1、ORF2以及ORF3三个开放阅读框,ORF1编码猫杯状病毒的非结构蛋白,ORF2编码猫杯状病毒的衣壳蛋白VP1,ORF3编码猫杯状病毒的结构蛋白VP2。衣壳蛋白是猫杯状病毒的必须结构蛋白,在病毒感染的过程中起主要作用,可作为猫杯状病毒检测中的标志物。

[0044] 本申请的发明人以衣壳蛋白作为猫杯状病毒检测的标记物,经过深入且广泛的研究确定了衣壳蛋白中的抗原优势区段,并得到一对抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对,该抗体对与猫杯状病毒衣壳蛋白具有良好的结合能力,能够不受其他病毒及药物的干扰,能够高特异性地实现对待测样品中猫杯状病毒或衣壳蛋白的定性、定量检测,提高了猫杯状病毒检测的精度和效率。

[0045] 本发明提供的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段中,包括第一抗体和第二抗体。

[0046] 第一抗体或其抗原结合片段中重链可变区互补决定区1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:1~3所示,轻链可变区互补决定区1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:4~6;第一抗体的重链可变区互补决定区1~3和轻链互补决定区1~3共同组成抗原结合位点,对于抗猫杯状病毒衣壳蛋白具有良好的特异性识别能力。

[0047] 在一些具体的实施方式中,第一抗体或其抗原结合片段的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示或者是与SEQ ID NO:13所示序列具有至少80%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列的氨基酸序列与SEQ ID NO:13所示序列的同源性可以是80%、85%、90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值;

[0048] 第一抗体或其抗原结合片段重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示或者是与SEQ ID NO:17所示序列具有至少70%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列的氨基酸序列与SEQ ID NO:17所示序列的同源性可以是70%、73%、75%、78%、80%、85%、90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值。

[0049] 在一些具体的实施方式中,第一抗体或其抗原结合片段的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示或者是与SEQ ID NO:14所示序列具有至少80%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列的氨基酸序列与SEQ ID NO:14所示序列的同源

性可以是80%、85%、90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值；
[0050] 第一抗体或其抗原结合片段的轻链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示或者是与SEQ ID NO:18所示序列具有至少70%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，变体序列的氨基酸序列与SEQ ID NO:17所示序列的同源性可以是70%、73%、75%、78%、80%、85%、90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值。

[0051] 第二抗体或其抗原结合片段中重链可变区互补决定区1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:7~9所示，轻链可变区互补决定区1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:10~12；第二抗体的重链可变区互补决定区1~3和轻链互补决定区1~3共同组成抗原结合位点，对于抗猫杯状病毒衣壳蛋白具有良好的特异性识别能力。

[0052] 在一些具体的实施方式中，第二抗体或其抗原结合片段的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示或者是与SEQ ID NO:15所示序列具有至少80%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，变体序列的氨基酸序列与SEQ ID NO:13所示序列的同源性可以是80%、85%、90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值；

[0053] 第二抗体或其抗原结合片段重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示或者是与SEQ ID NO:19所示序列具有至少70%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，变体序列的氨基酸序列与SEQ ID NO:17所示序列的同源性可以是70%、73%、75%、78%、80%、85%、90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值。

[0054] 在一些具体的实施方式中，第二抗体或其抗原结合片段的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示或者是与SEQ ID NO:16所示序列具有至少80%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，变体序列的氨基酸序列与SEQ ID NO:14所示序列的同源性可以是80%、85%、90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值；

[0055] 第二抗体或其抗原结合片段的轻链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示或者是与SEQ ID NO:20所示序列具有至少70%序列同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，变体序列的氨基酸序列与SEQ ID NO:17所示序列的同源性可以是70%、73%、75%、78%、80%、85%、90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值。

[0056] 本发明中所指的抗原结合片段为保留有与猫杯状病毒衣壳蛋白特异性结合能力的蛋白质分子，可以通过对第一抗体或第二抗体进行改性得到，也可以是通过基因工程技术进行制备得到，亦或是通过化学合成的方法制备得到。

[0057] 在一些具体的实施方式中，第一抗体或其抗原结合片段可以是但不限于Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、ScFv片段、dAb片段、双抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体和多克隆抗体中的一种或多种。

[0058] 在一些具体的实施方式中，第二抗体或其抗原结合片段可以是但不限于Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、ScFv片段、dAb片段、双抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体和多克隆抗体中的一种或多种。

[0059] 在实际使用的过程中为了便于检测结果的观测，在第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段上修饰或标记有可检测的标记，借助可检测的标记的有无以及

多少,实现对猫杯状病毒定性和定量检测。

[0060] 在一些具体的实施方式中,可检测的标记具体可以是但不限于放射性同位素、荧光染料、生物素、胶体金和酶中的一种或多种。

[0061] 本发明中提供的核酸分子,编码上述抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段。

[0062] 具体的,核酸分子包括序列如SEQ ID NO:21~24所示的核苷酸片段中的一段或多段,或者是与SEQ ID NO:21~24所示序列完全互补或在中度至高度严格条件下杂交的核苷酸片段中的一段或多段。

[0063] 在一些具体的实施方式中,核酸分可以是直接存在于宿主细胞内,亦或是负载于表达载体上,表达载体可以是pCMV-163表达载体、CMV4表达载体、pSV2表达载体中的一种或多种。

[0064] 本发明提供的胶体金试纸,包括上述的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段。

[0065] 在一些具体的实施方式中,胶体金试纸以第一抗体或其抗原结合片段作为捕获抗体制备检测线,将第二抗体或其抗原结合片段标记上胶体金作为标记抗体。

[0066] 在一些具体的实施方式中,胶体金试纸以第二抗体或其抗原结合片段作为捕获抗体制备检测线,将第一抗体或其抗原结合片段标记上胶体金作为标记抗体。

[0067] 其中,当第二抗体或其抗原结合片段与猫杯状病毒衣壳蛋白特异性结合后,猫杯状病毒衣壳蛋白的空间结构发生改变,使得猫杯状病毒衣壳蛋白上与第一抗体或其抗原结合片段的位点进一步暴露,有利于第一抗体或其抗原结合片段与猫杯状病毒衣壳蛋白的特异性结合,因而具有特别优秀的检测灵敏度和特异性。

[0068] 本申请提供的用于检测猫杯状病毒的试剂盒,该试剂盒包括上述的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段、核酸分子和胶体金试纸中的一种或多种。

[0069] 本发明还提供上述抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体对或其抗原结合片段、核酸分子、胶体金试纸和/或试剂盒在猫杯状病毒或其衣壳蛋白的定性和定量检测中的应用。

[0070] 下面详细描述本发明的实施例,所述实施例的示例旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0071] 本发明实施例中所涉及的试剂、细胞及器材的来源信息如下所示:

[0072] 弗氏完全佐剂(sigma公司,货号为F5881);

[0073] 弗氏不完全佐剂(sigma公司,货号为F5506);

[0074] 骨髓瘤细胞(ATCC,货号BNCC100908);

[0075] 1640培养基(VivaCell,货号C3010-0500);

[0076] PEG1500(罗氏,货号为10783641001);

[0077] 胎牛血清FBS(四季青,货号为11011-8611);

[0078] 青霉素-链霉素双抗(100×,上海生工,货号为E607011-0100);

[0079] HAT培养基添加剂(50×,sigma公司,货号为H0262);

[0080] HRP标记羊抗鼠二抗(厦门泰京,货号为TJ-211229CN);

- [0081] HT培养基添加剂(VivaCell,货号C3010-0500);
- [0082] 腹水专用佐剂(北京博奥龙,货号KX0210048);
- [0083] Protein A柱(博格隆生物,货号为AA301307);
- [0084] HRP(瑞思试剂,货号为RS20220118);
- [0085] 羊抗鼠IgG多克隆抗体(杭州隆基生物技术有限公司);
- [0086] BSA(Sigma,货号为V900933);
- [0087] 胶体金溶液(麦克林,货号为C805628);
- [0088] 猫杯状抗体-点膜(杭州基蓝生物科技有限公司,JLT0013-20220410);
- [0089] 猫杯状抗体-标记(杭州基蓝生物科技有限公司,JLT0013A-20220423)。
- [0090] 实施例1.
- [0091] 本实施例用于说明抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体或其抗原结合片段的制备、修饰以及鉴定,具体包括以下步骤。
- [0092] 一、单克隆细胞的制备
- [0093] 1、动物免疫
- [0094] 免疫对象为8周龄BALB/C雌鼠。
- [0095] 免疫所用的抗原为大肠杆菌重组表达的猫杯状病毒衣壳蛋白,其包括如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列。
- [0096] 免疫方式具体如下:
- [0097] 第一次免疫:在BALB/C雌鼠背部皮下分3-4点注射50 μ g的由重组猫杯状病毒衣壳蛋白和弗氏完全佐剂混合得到的浓度为50v/v%的第一免疫原溶液;
- [0098] 两周后进行第二次免疫,在BALB/C雌鼠背部皮下分3-4点注射50 μ g的由重组猫杯状病毒衣壳蛋白和弗氏不完全佐剂混合得到的浓度为50v/v%的第二免疫原溶液;
- [0099] 两周后进行第三次免疫,在BALB/C雌鼠背部皮下分3-4点注射50 μ g第二免疫原溶液;
- [0100] 两周后进行第四次免疫-冲击免疫,在BALB/C雌鼠腹腔注射50 μ g的由重组猫杯状病毒衣壳蛋白和生理盐水混合得到的浓度为50v/v%的第三免疫原溶液;
- [0101] 24h后进行第五次免疫,在BALB/C雌鼠尾静脉注射50 μ g第三免疫溶液原。
- [0102] 2、细胞免疫
- [0103] BALB/C雌鼠第五次免疫后的第三天开始细胞免疫。
- [0104] 细胞免疫的过程具体包括以下步骤:
- [0105] (1)脾细胞悬液的制备:在BALB/C雌鼠第五次免疫后的第三天,对BALB/c雌鼠摘除眼球采血,并分离BALB/c雌鼠血清作为抗体检测时的阳性对照;同时颈脱位致死BALB/c雌鼠,取其脾脏,制备脾细胞悬液;
- [0106] 骨髓瘤细胞悬液的制备:提前两周(保证使用时骨髓瘤细胞处于对数生长期)复苏骨髓瘤细胞,制得骨髓瘤细胞悬液;
- [0107] 饲养层细胞的制备:在进行细胞融合的前一天,取空白BALB/c雌鼠腹腔巨噬细胞和脾细胞,加入96孔板培养,得到含饲养层细胞的细胞板(细胞浓度为 1×10^4 /孔),制得饲养层细胞;
- [0108] (2)细胞融合过程:

[0109] 采用聚乙二醇(PEG)介导细胞融合,取脾细胞悬液与骨髓瘤细胞悬液,按照细胞数量比为5:1的比例,在无血清的1640培养基中混匀,于1200rpm条件下离心5min,去掉上清;

[0110] 用手指轻弹离心管底部,使两种细胞松散混匀,置于装有37℃水的烧杯中保温,在1min内加入1mL的50%PEG1500(pH 8.0)融合细胞,边加边摇动,加完后静置30s;加入无血清的1640培养基终止融合,于800rpm条件下离心5min,沉淀用HAT培养基悬浮,分装到含饲养层细胞的细胞板中,获得含融合细胞-饲养层细胞的细胞板,并置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养;

[0111] 其中,配制500mL的HAT培养基需要以下试剂:100mL胎牛血清FBS、5mL的细胞培养用青霉素-链霉素双抗(100×)、10mL的HAT培养基添加剂(50×)和385mL的1640培养基。

[0112] 3、阳性杂交瘤细胞的筛选

[0113] 将上述含融合细胞-饲养层细胞的细胞板培养至第4天进行半换液,继续培养至第7天进行全换液,当融合细胞覆盖孔底10~50%时,利用常规间接ELISA方法筛选阳性孔。

[0114] 间接ELISA方法具体包括以下步骤:

[0115] (1)包板:利用重组猫杯状病毒衣壳蛋白作为包被抗原,用pH值为9.6的0.05mol/L CB缓冲液(31.8g的Na₂CO₃、58.8g的NaHCO₃,并用超纯水补足至2L)稀释至2μg/mL,以100μL/孔加入酶标板,4℃包被过夜后拍干,用质量体积比为1%的明胶-PBS缓冲液封闭,300μL/孔,4℃封闭过夜后拍干备用。

[0116] (2)检测:将含融合细胞-饲养层细胞的细胞板中的细胞培养上清液,以100μL/孔加入酶标板,放置37℃孵育60min后,用含Tween-20的0.01mol/L的PBST缓冲液洗涤并拍干,加入100μL/孔的HRP标记羊抗鼠二抗,放置37℃孵育60min后洗涤并拍干,加入100μL/孔的TMB显色液,放置37℃避光显色10min,加入50μL/孔的1mol/L HCl终止反应。

[0117] 同时,以细胞免疫中眼球采血分离获得的BALB/c雌鼠血清作为阳性对照,筛选出抗体效价较高的融合细胞,即为阳性杂交瘤细胞。

[0118] 4、阳性杂交瘤细胞的克隆化

[0119] 从含融合细胞-饲养层细胞的细胞板中筛选得到的阳性杂交瘤细胞,来源于两个以上的杂交瘤细胞,故筛选得到的杂交瘤细胞分泌的抗体是不同质的。为了获得完全同质的单克隆抗体,需要对阳性杂交瘤细胞进行克隆化。

[0120] 进行克隆化的前一天,按照细胞免疫中步骤(1)的方法制备饲养层细胞并铺板,得到含饲养层细胞的细胞板;利用HT培养基将筛选获得的阳性杂交瘤细胞悬浮并利用移液器吹打混匀,接种至含饲养层细胞的细胞板,并利用HT培养基将细胞板孔内细胞稀释至每个孔内1个细胞,置于37℃、5%CO₂湿润培养7~10d,出现肉眼可见的克隆细胞,即可检测抗体。

[0121] 其中,配制500mL的HT培养基需要以下试剂:100mL的胎牛血清FBS、5mL的细胞培养用青霉素-链霉素双抗、10mL的HT培养基添加剂以及385mL的1640培养基。

[0122] 在倒置显微镜下观察,标出只有单个克隆生长的孔,最终初步筛选获得了10株细胞株,取上清进行下一步的功能筛选。对上述10株细胞株进行命名,具体如表1所示。

[0123] 表1.

[0124]	细胞株	单克隆抗体	HRP-抗体偶联复合蛋白
--------	-----	-------	--------------

[0125]	5B10 细胞株	5B10 抗体	HRP-5B10 抗体
	5G2 细胞株	5G2 抗体	HRP-5G2 抗体
	5H11 细胞株	5H11 抗体	HRP-5H11 抗体
	7D9 细胞株	7D9 抗体	HRP-7D9 抗体
	9C4 细胞株	9C4 抗体	HRP-9C4 抗体
	4G3 细胞株	4G3 抗体	HRP-4G3 抗体
	1G11 细胞株	1G11 抗体	HRP-1G11 抗体
	20H1 细胞株	20H1 抗体	HRP-20H1 抗体
	15G4 细胞株	15G4 抗体	HRP-15G4 抗体
	12H7 细胞株	12H7 抗体	HRP-12H7 抗体

[0126] 二、抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体的制备

[0127] (1) 腹水的制备:向8-10周龄的Balb/c小鼠腹腔注射腹水专用佐剂,注射后第10d将实施例1制备得到的细胞株(1×10^6 个细胞/只)注射到Balb/c小鼠腹腔,再过12d用医用注射器收集Balb/c小鼠腹水。

[0128] (2) 抗体的纯化:将步骤(1)收集好的Balb/c小鼠腹水倒入离心管中,12500rpm离心20min,收集上清并依次用0.22 μ m滤膜过滤、Protein A柱亲和层析纯化。

[0129] 利用Protein A柱亲和层析纯化的具体步骤如下:

[0130] 装柱:取5mL的Protein A Resin介质加入层析柱静置,使用10个柱体积的超纯水冲洗层析柱;

[0131] 平衡:使用10个柱体积的预冷的Protein A柱平衡液(50mM的Tris-HCl,100mM的NaCl,溶剂为水,pH=8.0)平衡层析柱;

[0132] 上样:将0.22 μ m滤膜过滤后的样品上样,流速为5mL/min;

[0133] 洗涤:用10个柱体积的预冷的Protein A柱平衡液清洗层析柱;

[0134] 洗脱:用洗脱液(100mM的Glycine,150mM的NaCl,溶剂为水,pH=3.0)洗脱抗体,获得包含抗体的洗脱缓冲液;洗脱后立即将中和缓冲液(2M的Tris-HCl,溶剂为水,pH=9.0)加入洗脱缓冲液至溶液为中性pH;

[0135] 透析:洗脱得到的抗体在1000倍洗脱体积的PBS(pH=7.4)溶液中透析三次,获得纯化后的10株抗体,具体命名如表1所示。

[0136] 三、HRP-抗体偶联复合蛋白的制备

[0137] (1) 将10株抗体分别用pH=9.6的0.05mol/L的CB缓冲液稀释至2mg/mL;根据目标蛋白分子量大小截留实际需求及透析体积进行选取透析膜并裁剪适当长度;提前用pH=9.6的0.05mol/L的CB缓冲液浸泡处理透析膜,更换pH=9.6的0.05mol/L的CB缓冲液继续浸泡洗涤透析膜一次。将1mL抗体蛋白溶液转移至透析膜中。在pH=9.6的0.05mol/L的CB缓冲液,于4 $^{\circ}$ C下搅拌透析,每隔1h换液一次,共透析5次。

[0138] (2) 将HRP溶于超纯水中配成浓度为20mg/mL的HRP溶液,将NaIO₄溶于超纯水配成浓度为20mg/mL的NaIO₄溶液;涡旋充分溶解后,将HRP溶液和NaIO₄溶液按1:1的体积比混合,即NaIO₄溶液缓慢加入HRP溶液中,立即用锡纸包裹离心管,避光、4 $^{\circ}$ C下活化HRP 30min。

[0139] (3) 将乙二醇缓缓滴加至HRP活化的离心管中并同时轻微震荡(每1mg的HRP加入1 μ L乙二醇),继续4 $^{\circ}$ C避光30min,终止HRP活化。

[0140] (4) 将终止活化的HRP溶液加入至抗体透析膜内(1mg抗体加入1mg的HRP和1mg的NaIO₄),于pH=9.6的0.05mol/L的CB缓冲液中,于4 $^{\circ}$ C、避光下偶联过夜。第二天继续更换pH

=9.6的0.05mol/L的CB缓冲液后,继续透析2h。透析后将偶联的透析液转移至离心管中,获得抗体-HRP偶联液。

[0141] (5)用纯水配制浓度为20mg/mL的 NaBH_4 溶液加入到步骤(4)中的抗体-HRP偶联液中,加入量为每1mg的HRP加入量为2 μL 的 NaBH_4 溶液,于4℃下反应2h,每0.5h上下颠倒混匀几下,获得偶联复合蛋白液。

[0142] (6)用50%硫酸铵(即等体积饱和浓度的硫酸铵与步骤(5)中获得的偶联复合蛋白液1:1混合)沉淀偶联复合蛋白,于4℃下沉淀15min,并10000rpm离心10min,去上清,得到10株HRP-抗体偶联复合蛋白,具体命名如表1所示。

[0143] 四、抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体的筛选

[0144] 将上述10株抗体和HRP-抗体偶联复合蛋白进行两两配对,并采用双抗夹心ELIS法对抗体进行筛选,具体步骤如下所示。

[0145] 将10株抗体作为捕获抗体分别包被于酶标板上,接着向酶标板的孔中加入重组猫杯状病毒衣壳蛋白,孵育后洗去未结合的重组猫杯状病毒衣壳蛋白;再加入HRP-抗体偶联复合蛋白作为标记抗体,孵育后洗去未结合的HRP-抗体偶联复合蛋白,最后加入显色液显色,并利用分光光度计再280nm下测定吸光度,测试结果如表2所示。

[0146] 表2.

捕获抗体	检测结果									
	标记抗体(HRP-抗体类型)									
	5B10	5G2	5H11	7D9	9C4	4G3	1G11	20H1	15G4	12H7
5B10	0.1139	0.3766	0.5923	0.8836	1.0856	1.9819	0.5036	0.1247	0.8917	1.2936
5G2	0.4018	0.0890	0.1170	0.0873	2.7821	0.0805	0.0925	0.0897	0.0774	0.0716
5H11	0.6784	0.0805	0.0795	0.0749	0.0928	0.0733	0.0908	0.0776	0.0828	0.0722
[0147] 7D9	0.0959	0.0831	0.0872	0.0869	1.2930	2.0846	0.5966	0.0854	0.8132	1.1061
9C4	1.0944	2.0869	0.9813	0.2842	0.1957	0.7782	0.0846	0.7807	1.1190	1.5845
4G3	1.8921	0.0934	0.0838	0.0842	0.0987	0.1066	0.0903	0.1069	0.1054	0.0840
1G11	0.7888	0.0894	0.0914	0.0991	0.1125	0.0903	0.0863	0.1365	0.4671	0.0884
20H1	0.0910	0.0788	0.0833	0.0894	0.0888	0.0869	0.0853	0.0865	0.0792	0.0744
15G4	0.6932	0.0894	0.0769	0.4794	0.6051	0.0945	0.0899	0.0780	0.2628	0.2148
12H7	1.1119	0.0700	0.0856	0.0852	0.0916	0.5954	0.7734	0.0765	0.1629	0.0921

[0148] 由测试结果可知,5G2抗体和9C4抗体这一对抗体效价高,可应用于猫杯状病毒衣壳蛋白的检测中。

[0149] 实施例2.

[0150] 本实施例中分别扩大培养5G2细胞和9C4细胞,并收集 5×10^6 个细胞/mL于离心管中,吸干上清,冻存,干冰寄送至南京德泰生物工程有限公司进行杂交瘤细胞测序,测序结果如表3所示。

[0151] 表3.

[0152]	5G2 细胞	5G2 抗体	重链可变区	SEQ ID NO:13
			重链恒定区	SEQ ID NO:17
			轻链可变区	SEQ ID NO:14
			轻链恒定区	SEQ ID NO:18
	9C4 细胞	编码 DNA 的核苷酸序列	重链可变区	SEQ ID NO:21
			轻链可变区	SEQ ID NO:22
		9C4 抗体	重链可变区	SEQ ID NO:15
			重链恒定区	SEQ ID NO:19
			轻链可变区	SEQ ID NO:16
			轻链恒定区	SEQ ID NO:20
编码 DNA 的核苷酸序列	重链可变区	SEQ ID NO:23		
	轻链可变区	SEQ ID NO:24		

[0153] 实施例3.

[0154] 本实施例用于说明用于猫杯状病毒非诊断目的检测的胶体金试纸的制备,以5G2抗体作为捕获抗体,以9C4抗体作为标记抗体,该胶体金试纸的制备具体包括以下步骤。

[0155] 一、检测垫的制备

[0156] (1) 包被缓冲液的配制:称取2.901g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2914g的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、8.5g的NaCl以及25g的蔗糖,溶于1000mL的超纯水中,调节pH为7.4,置于4℃下保存备用。

[0157] (2) 检测线制备:取1mg/mL的5G2抗体,在硝酸纤维膜上制备检测线,喷涂量为1.0μL/cm,喷涂长度为30cm。

[0158] (3) 质控线制备:取1mg/mL的羊抗鼠IgG多克隆抗体,在硝酸纤维膜上制备质控线,喷涂量为1.0μL/cm,喷涂长度为30cm,且质控线和检测线的距离为5mm。

[0159] (4) 将包被好检测线和质控线的硝酸纤维膜即为检测垫,将检测垫贴在PVC衬板上,置于50℃的烘箱中干燥 $24 \pm 2\text{h}$ 。

[0160] 二、金标结合物的制备

[0161] (1) 复溶液的配制:称取0.36g的Tris、0.3g的酪蛋白钠、0.2g的PEG20000、100μL的TW-20、2g蔗糖以及100μL的proclin300溶于100mL的超纯水中,调节pH至8.0,置于4℃下保存备用。

[0162] (2) 标记过程:取100mL的0.01%胶体金溶液置于干净的容器中,加入0.9~2.0mL的0.2M的 K_2CO_3 溶液搅拌均匀;再加入500~1500μg的9C4抗体,搅拌反应10~20min;接着加入5mL的20% BSA溶液进行搅拌,封闭10-20min,于8000-10000r/min离心20-30min后弃上清,得到的沉淀用复溶液10倍浓缩复溶,获得金标结合物,置于4℃下保存备用。

[0163] 三、结合垫的制备

[0164] (1) 金标结合物溶液的配制:0.362g的Tris、0.2g的酪蛋白钠、0.2g的PEG20000、100μL的TW-20、3g蔗糖、2g海藻糖以及100μL的proclin300溶于100mL超纯水中,调节至pH为8.0,置于4℃下保存备用。

[0165] (2) 将金标结合物按7~15%浓度,加入金标结合物溶液中,混合均匀,并均匀涂布在玻璃纤维膜(35mL/张),置于50℃的烘箱中干燥 $24 \pm 2\text{h}$ 。

[0166] 四、样品垫的制备

[0167] (1) 样本垫处理液的配制:0.242g的Tris、0.5g的酪蛋白钠、0.1g的PVP-40,100μL的proclin300溶于100mL超纯水中,调节pH至8.0,置于4℃下保存备用。

[0168] (2)按每板32mL样本垫处理液,均匀涂布在玻璃纤维膜,置于50℃的烘箱中干燥24±2h,检测鉴定合格后,置于室温密封保存备用。

[0169] 五、胶体金试纸的组装

[0170] 依次将结合垫、样品垫粘贴在PVC板靠近检测线的一端,且样品垫部分搭接在结合垫上,结合垫部分搭接在检测垫上;将吸水纸粘贴在PVC板远离检测线的一端,且吸水纸部分搭接在检测垫上。

[0171] 实施例4.

[0172] 本实施例采用实施例3提供的方法制备胶体金试纸,不同之处在于,胶体金试纸中以9C4抗体作为捕获抗体,以5G2抗体作为标记抗体,其他的条件相同。

[0173] 实施例5.

[0174] 本实施例用于说明本发明提供的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体或其抗原结合片段的检测灵敏度。

[0175] 实验组:实施例3和实施例4中提供的胶体金试纸;

[0176] 对照组:按照实施例3提供的方法制备胶体金试纸,不同之处在于,胶体金试纸中以猫杯状抗体-点膜作为捕获抗体、以猫杯状抗体-标记作为标记抗体其他的条件相同。

[0177] 检测方法:以灭活的原始猫杯状病毒培养液作为检测对象,利用稀释液(成分:10mM PBS)依次按照1:100、1:200、1:500、1:1000、1:5000以及1:10000稀释后,分别滴加至上述实验组和对照组的胶体金试纸的样品垫上,5~10min后观察结果。图1~3和表4为本发明提供的抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段的灵敏度检测结果。

[0178] 表4.

稀释倍数	实验组		对照组
	实施例 3	实施例 4	
100 倍	强阳性	强阳性	中阳性
200 倍	强阳性	中阳性	弱阳性
[0179] 500 倍	中阳性	中阳性	弱阳性
1000 倍	中阳性	弱阳性	阴性
5000 倍	弱阳性	弱阳性	阴性
10000 倍	弱阳性	阴性	阴性
稀释液	阴性	阴性	阴性

[0180] 由图1~3以及表4所示的检测结果显示,本发明实施例3和4提供的胶体金试纸在原始猫杯状病毒培养液稀释至1000倍时仍能观察到明显的条带,而对照组中的胶体金试纸在原始猫杯状病毒培养液稀释至200倍时已无法检测猫杯状病毒,相较于对照组中使用到的现有常规的抗体对,本发明中提供的9C4抗体和5G2抗体这一对抗体对具有优秀的检测灵敏度。

[0181] 实施例6.

[0182] 本实施例用于说明本发明提供的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体或其抗原结合片段的检测特异性。

[0183] 实验组:实施例3和实施例4中提供的胶体金试纸;

[0184] 对照组:按照实施例3提供的方法制备胶体金试纸,不同之处在于,胶体金试纸中以猫杯状抗体-点膜作为捕获抗体、以猫杯状抗体-标记作为标记抗体其他的条件相同。

[0185] 检测方法:以表5中提供的物质作为检测对象,分别滴加至上述实验组和对照组的

胶体金试纸的样品垫上,5~10min后观察结果。图4~6和表5为本发明提供的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体或其抗原结合片段的特异性检测结果。

[0186] 表5.

检测对象	实验组		对照组
	实施例 4	实施例 5	
原始猫杯状病毒液	强阳性	强阳性	强阳性
Urbana 型猫杯状病毒液	强阳性	中阳性	弱阳性
FCV-131 型猫杯状病毒液	强阳性	中阳性	中阳性
TFHLJ-8 型猫杯状病毒液	强阳性	中阳性	中阳性
FB-NJ-13 型猫杯状病毒液	强阳性	强阳性	强阳性
猫疱疹病毒液	阴性	阴性	弱阳性
猫冠状病毒液	阴性	阴性	阴性
猫细小病毒液	阴性	阴性	阴性
Vero 细胞裂解液	阴性	阴性	弱阳性
新生牛血清	阴性	阴性	阴性
MEM 培养基	阴性	阴性	阴性
1%BSA	阴性	阴性	阴性

1%脱脂奶粉	阴性	阴性	阴性
--------	----	----	----

[0189] 由图4~6和表5所示的检测结果可知,相较于对照组中的胶体金试纸,本发明实施例3和实施例4中所提供的胶体金试纸能特异性识别多种猫杯状病毒的变异毒株,且与引起猫常见临床疾病其他病毒不发生阳性反应,本发明中提供的9C4抗体和5G2抗体这一对抗体对具有良好的检测特异性。

[0190] 实施例7.

[0191] 本实施例用于说明本发明提供的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体或其抗原结合片段的稳定性。

[0192] 实验组:实施例3和实施例4中提供的胶体金试纸;

[0193] 对照组:按照实施例3提供的方法制备胶体金试纸,不同之处在于,胶体金试纸中以猫杯状抗体-点膜作为捕获抗体、以猫杯状抗体-标记作为标记抗体其他的条件相同。

[0194] 将实验组和对照组中的胶体金试纸在45℃存放1、2、3、4和5个月,进行加速稳定性实验。分别检测浓度相同的猫杯状病毒培养物稀释液。图7~12和表6为本发明提供的抗猫杯状病毒衣壳蛋白抗体或其抗原结合片段的加速稳定性检测结果。

[0195] 表6.

放置时间/月	实验组		对照组
	实施例 3	实施例 4	
起始	弱阳性	弱阳性	弱阳性
1	弱阳性	弱阳性	弱阳性
2	弱阳性	弱阳性	弱阳性
3	弱阳性	弱阳性	弱阳性
4	弱阳性	弱阳性	弱阳性
5	弱阳性	弱阳性	阴性/弱阳性

[0197] 由图7~12和表6所示的检测结果可知,本发明实施例3和实施例4中提供的胶体金试纸在5个月内的加速稳定性实验检测结果一致,而使用现有抗体得到的胶体金试纸在加

速稳定性实验第5个月时检测结果出现偏差,说明对照组中的胶体金试纸在加速稳定性实验第5个月已发生变质。相较于现有抗体而言,本发明实施例3和实施例4中所提供的胶体金试纸具有良好的稳定性。

[0198] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

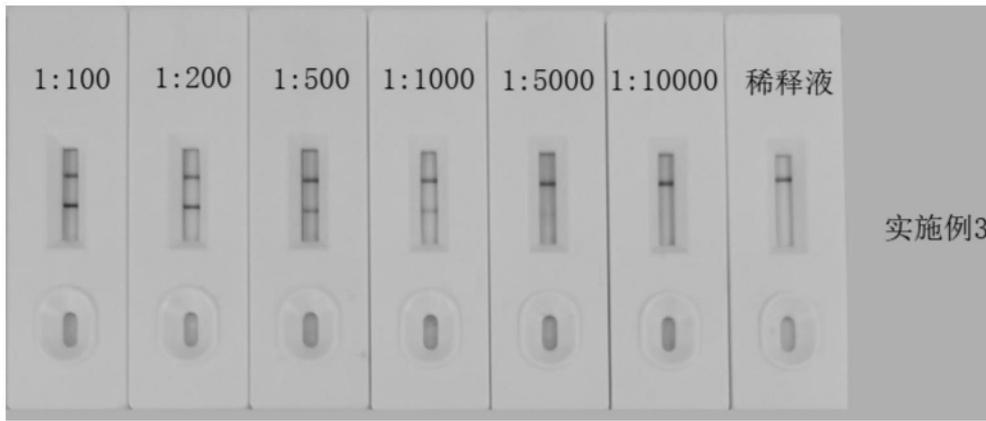


图1

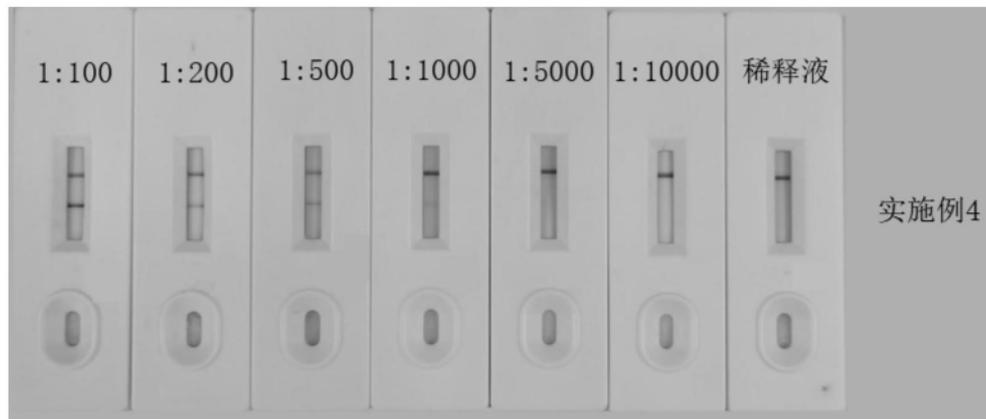


图2

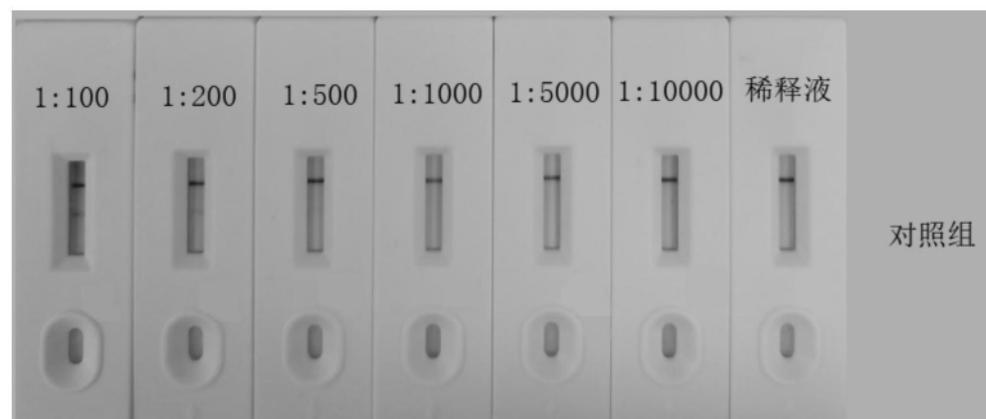


图3

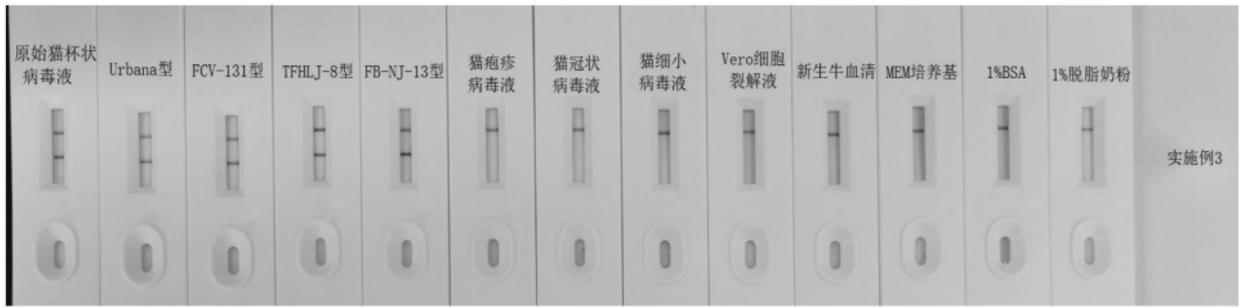


图4

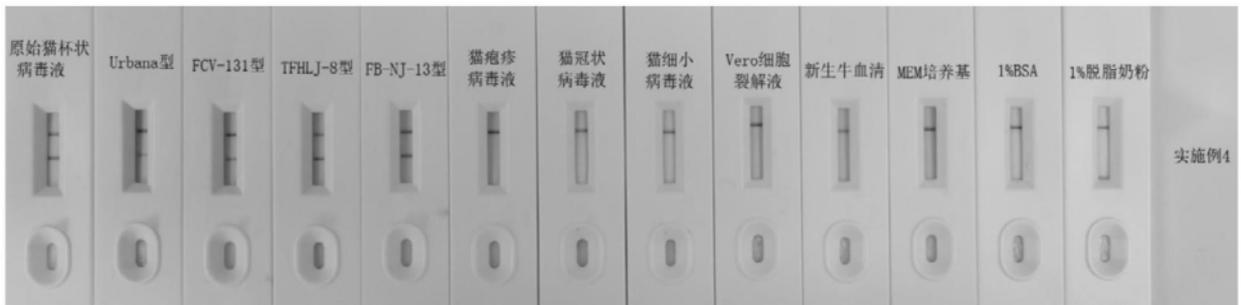


图5



图6

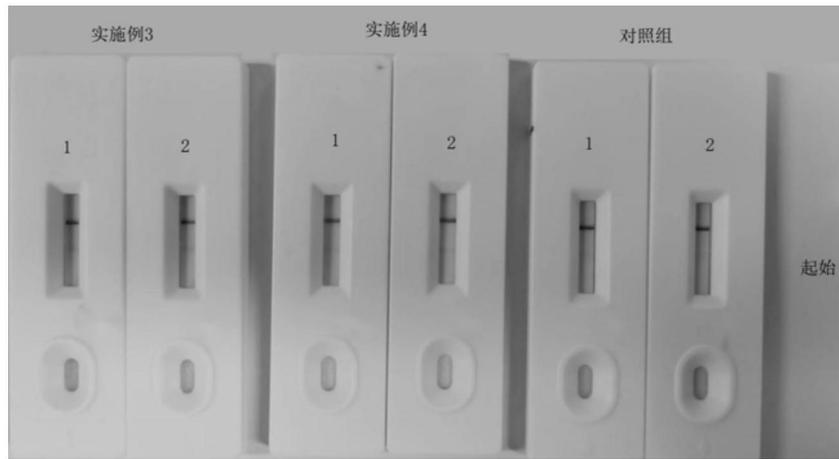


图7



图8

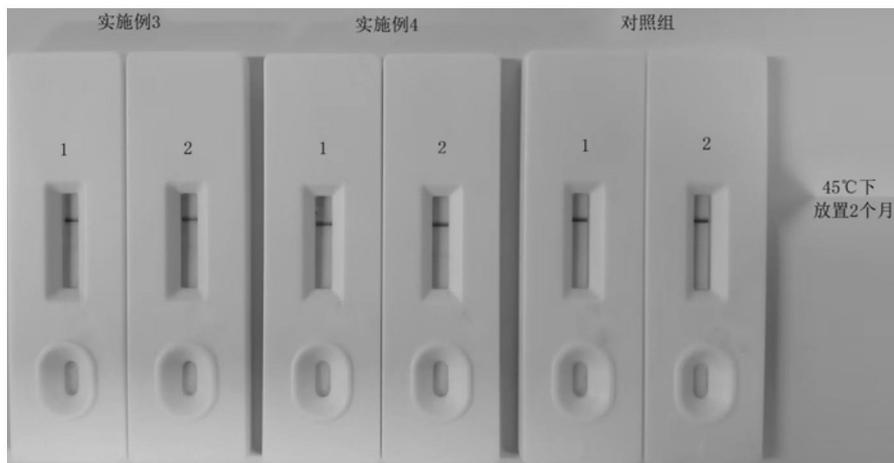


图9

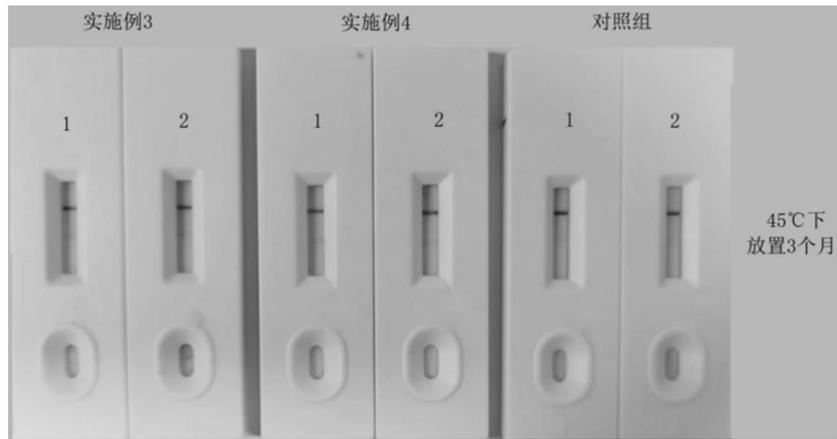


图10

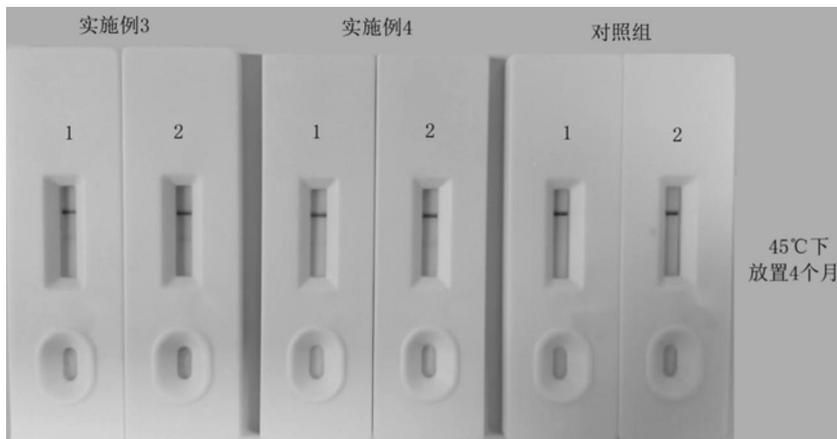


图11



图12