



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116375854 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 04

(21) 申请号 202310416014.0

C12N 5/20 (2006.01)

(22) 申请日 2023.04.18

C12P 21/08 (2006.01)

(71) 申请人 领地动物诊疗科技(厦门)有限公司

G01N 33/577 (2006.01)

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

G01N 33/569 (2006.01)

申请人 厦门同仁心生物技术有限公司

C12R 1/91 (2006.01)

(72) 发明人 张涛 邹柳 林奕婷 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 16/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

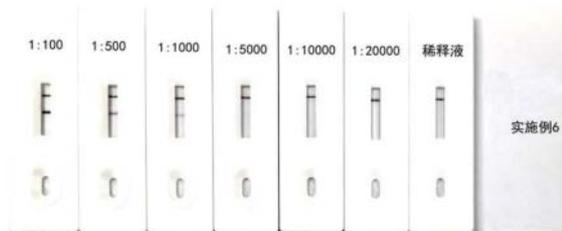
权利要求书1页 说明书14页
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

抗犬冠状病毒N蛋白抗体对及其制备方法、核酸分子、细胞株和应用

(57) 摘要

本发明属于生物医学检测的技术领域,公开了一种抗犬冠状病毒N蛋白抗体对及其制备方法、核酸分子、细胞株和应用。所述抗体对或其抗原结合片段包括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所示的第一抗体或其抗原结合片段;和,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所示的第二抗体或其抗原结合片段。本发明提供的抗体对具有高效价,均与犬冠状病毒N蛋白具有强结合能力,能够不受其他病毒及药物的干扰,实现对犬冠状病毒的高特异性和高灵敏度检测。



1. 一种抗体对或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体对或其抗原结合片段包括:重链可变区互补决定区1~3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1~3所示、轻链可变区互补决定区1~3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4~6所示的第一抗体或其抗原结合片段;

和,重链可变区互补决定区1~3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:7~9所示、轻链可变区互补决定区1~3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:10~12所示的第二抗体或其抗原结合片段。

2. 根据权利要求1所述的抗体对或其抗原结合片段,其特征在于,所述第一抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示、轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示;

所述第二抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示、轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。

3. 根据权利要求1所述的抗体对或其抗原结合片段,其特征在于,所述第一抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、单链抗体、嵌合抗体、多特异抗体、单克隆抗体和多克隆抗体中的一种或多种;

任选地,所述第二抗体或其抗原结合片段选Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、单链抗体、嵌合抗体、多特异抗体、单克隆抗体和多克隆抗体中的一种或多种。

4. 一种核酸分子,其特征在于,编码权利要求1~3任一所述的抗体对或其抗原结合片段。

5. 一种分泌权利要求1~3任一所述的抗体对或其抗原结合片段的细胞株,其特征在于,所述细胞株为杂交瘤细胞株和/或含有抗体对或其抗原结合片段基因库的大肠杆菌细胞株。

6. 一种制备权利要求1~3任一所述的抗体对或其抗原结合片段的方法,其特征在于,所述方法包括:在合适的条件下培养权利要求5所述的细胞株,从细胞培养物中回收单克隆抗体对或其抗原结合片段。

7. 一种试剂盒,其特征在于,包括权利要求1~3任一所述的抗体对或其抗原结合片段。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗体或其抗原结合片段还包括可检测的标记,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,所述第二抗体或其抗原结合片段还包括可检测的标记,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。

9. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗体或其抗原结合片段为捕获抗体,所述第二抗体或其抗原结合片段为标记抗体。

10. 权利要求1~3任一所述的抗体对或其抗原结合片段、权利要求4所述的核酸分子、权利要求5所述的细胞株或权利要求7~9任一所述的试剂盒在非诊断目的的犬冠状病毒检测中的应用。

抗犬冠状病毒N蛋白抗体对及其制备方法、核酸分子、细胞株和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学检测的技术领域,尤其涉及一种抗犬冠状病毒N蛋白抗体对及其制备方法、核酸分子、细胞株和应用。

背景技术

[0002] 犬冠状病毒(CCoV)属于网巢病毒目、冠状病毒科、 α 冠状病毒属,以病犬以及带病犬的粪便和污染水源为主要传染源,经粪口途径进入易感犬的体内,且犬冠状病毒的感染没有物种的特异性,不同品种、年龄的犬只均有可能被感染,而犬冠状病毒感染后犬只会出精神不振、呕吐、腹泻、血便等临床症状,随着病程的发展可能会导致犬只出现严重脱水或酸中毒,最终导致犬只死亡,对犬养殖业造成了严重的威胁。

[0003] 犬冠状病毒是一类具有囊膜结构的单链RNA病毒,呈圆球形或椭圆性,表面均匀分布有冠状病毒特有的放射形凸起,其结构蛋白包括位于囊膜表面的S蛋白、以跨膜蛋白形式存在于膜表面的M蛋白、位于M蛋白下层的E蛋白以及位于囊膜内构成病毒粒子核衣壳的N蛋白。

[0004] 目前,可以电镜观察法、PCR扩增技术、重组酶聚合酶扩增检测法、病毒中和试验、间接ELISA法以及间接免疫荧光法等方法对犬冠状病毒进行检测。但是,上述大部分方法在检测时需要特殊的设备、试剂和专业的检测人员,且存在着检测周期长、操作繁琐、成本高、灵敏度低以及特异性差等问题。

发明内容

[0005] 为了实现对犬冠状病毒的快速、高灵敏度以及强特异性的检测,本发明提供了一种抗犬冠状病毒N蛋白抗体对及其制备方法、核酸分子、细胞株和应用。

[0006] 第一方面,本发明提供一种抗体对或其抗原结合片段采用以下的技术方案:

[0007] 抗体对或其抗原结合片段包括:重链可变区互补决定区1~3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1~3所示、轻链可变区互补决定区1~3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4~6所示的第一抗体或其抗原结合片段;和,重链可变区互补决定区1~3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:7~9所示、轻链可变区互补决定区1~3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:10~12所示的第二抗体或其抗原结合片段。

[0008] 在一些具体的实施方式中,所述第一抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示、轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示;所述第二抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示、轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。

[0009] 在一些具体的实施方式中,所述第一抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、 $(ab')_2$ 、Fd、Fv、dAb、单链抗体、嵌合抗体、多特异抗体、单克隆抗体和多克隆抗体中的一种或多种。

[0010] 在一些具体的实施方式中,所述第一抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、单链抗体、嵌合抗体、多特异抗体、单克隆抗体和多克隆抗体中的一种或多种。

[0011] 第二方面,本发明提供了一种核酸分子,该核酸分子编码上述抗体对或其抗原结合片段。

[0012] 第三方面,本发明提供了一种细胞株,该细胞株分泌上述抗体对或其抗原结合片段。

[0013] 在一些具体的实施方式中,所述细胞株为杂交瘤细胞株和/或含有抗体对或其抗原结合片段基因库的大肠杆菌细胞株。

[0014] 第四方面,本发明提供了一种试剂盒,该试剂盒包括上述抗体对或其抗原结合片段、核酸分子和细胞株中的一种或多种。

[0015] 在一些具体的实施方式中,所述第一抗体或其抗原结合片段还包括可检测的标记,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。

[0016] 在一些具体的实施方式中,所述第二抗体或其抗原结合片段还包括可检测的标记,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。

[0017] 在一些具体的实施方式中,所述第一抗体或其抗原结合片段为捕获抗体,所述第二抗体或其抗原结合片段为标记抗体。

[0018] 第五方面,本发明提供了上述抗体对或其抗原结合片段、核酸分子、细胞株或试剂盒在非诊断目的的犬冠状病毒检测中的应用。

[0019] 有益效果:

[0020] 本发明中提供的第一抗体或其抗原结合片段、第二抗体或其抗原结合片段与犬冠状病毒N蛋白均具有高亲和力;其中,以第一抗体或其抗原结合片段作为捕获抗体、第二抗体或其抗原结合片段作为标记抗体时,第二抗体与犬冠状病毒N蛋白的结合能够提高N蛋白与第一抗体的结合能力,两者配合使用时,能够不受其他疾病病毒株及药物的交叉干扰,实现对犬冠状病毒N蛋白的高特异性和高灵敏度检测,从而建立一种快速、简便、成本低、灵敏度高以及特异性强的犬冠状病毒检测方法。

附图说明

[0021] 图1为本发明测试例中实施例6提供的胶体金层析纸条对不同稀释倍数灭活犬冠状病毒液的检测结果图;

[0022] 图2为本发明测试例中实施例7提供的胶体金层析纸条对不同稀释倍数灭活犬冠状病毒液的检测结果图;

[0023] 图3为本发明测试例中对比例提供的胶体金层析纸条对不同稀释倍数灭活犬冠状病毒液的检测结果图。

具体实施方式

[0024] 在犬冠状病毒中的N蛋白高度保守,与病毒的正链RNA紧密结合形成核糖核蛋白结构,构成病毒的核心,在病毒基因组RNA的复制和翻译中起重要作用,是犬冠状病毒感染全过程中最丰富的蛋白质。因此,在本发明中提供一种抗体对及其抗原结合片段,该抗体对及

其抗原结合片段能与犬冠状病毒N蛋白特异性结合,作为检测物质检测样品中犬冠状病毒或其N蛋白的存在。

[0025] 本发明提供的抗体对及其抗原结合片段中,包括第一抗体及其抗原结合片段和第二抗体及其抗原结合片段。

[0026] 在第一抗体及其抗原结合片段中,相邻的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示的重链可变区与氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示的轻链可变区折叠形成一个具有特定三维空间结构的犬冠状病毒N蛋白结合位点,并通过氨基酸序列如SEQ ID NO:1~3所示的重链可变区互补决定区1~3和氨基酸序列如SEQ ID NO:4~6所示的轻链可变区互补决定区1~3特异性识别和靶向犬冠状病毒N蛋白上的抗原决定簇。

[0027] 本发明中,第一抗体及其抗原结合片段的重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,轻链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:18。

[0028] 在第二抗体及其抗原结合片段中,相邻的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的重链可变区与氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的轻链可变区折叠形成一个具有特定三维空间结构的犬冠状病毒N蛋白结合位点,并通过氨基酸序列如SEQ ID NO:7~9所示的重链可变区互补决定区1~3和氨基酸序列如SEQ ID NO:10~12所示的轻链可变区互补决定区1~3特异性识别和靶向犬冠状病毒N蛋白上的另一抗原决定簇的。

[0029] 本发明中,第二抗体及其抗原结合片段的重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示,轻链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示。

[0030] 本发明中,抗体对或其抗原结合片段可以是包含全长抗体片段的多肽;或者是保留有与犬冠状病毒N蛋白具有强特异性结合能力片段的多肽,具体可根据需要选择相应类型的多肽;其中,包含全长抗体片段的多肽具体地可以是但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、基因工程抗体中的一种或多种;保留有与犬冠状病毒N蛋白具有强特异性结合能力片段的多肽具体地可以是但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv或dAb中的一种或多种。

[0031] 在一些具体的实施方式中,第一抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、单链抗体、嵌合抗体、多特异抗体、单克隆抗体和多克隆抗体中的一种或多种。

[0032] 在一些具体的实施方式中,第二抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、单链抗体、嵌合抗体、多特异抗体、单克隆抗体和多克隆抗体中的一种或多种。

[0033] 本发明中还提供了一种核酸分子,其编码上述单克隆抗体对或其抗原结合片段。

[0034] 在一些具体的实施方式中,核酸分子包括了编码第一抗体及其抗原结合片段中重链可变区的片段,该片段的核苷酸序列如SEQ ID NO:21所示;还包括了编码第一抗体及其抗原结合片段中轻链可变区的片段,该片段的核苷酸序列如SEQ ID NO:22所示。

[0035] 在一些具体的实施方式中,核酸分子包括了编码第二抗体及其抗原结合片段中重链可变区的片段,该片段的核苷酸序列如SEQ ID NO:23所示;还包括了编码第二抗体及其抗原结合片段中轻链可变区的片段,该片段的核苷酸序列如SEQ ID NO:24所示。

[0036] 本发明中,不限制该核酸分子的制备方法,具体的可以是但不限于采用DNA提取技术从杂交瘤细胞中提取获得、或采用工程重组技术和化学合成方法合成得到。

[0037] 本发明中还提供了一种细胞株,可合成并分泌第一抗体或其抗原结合片段,或合成并分泌第二抗体或其抗原结合片段,亦或可同时分泌上述物质。

[0038] 在一些具体的实施方式中,细胞株为杂交瘤细胞株,具体的制备方法为:采用犬冠

状N蛋白或重组犬冠状N蛋白免疫小鼠得到免疫脾细胞,将免疫脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合得到杂交瘤细胞株,该杂交瘤细胞株可以分泌第一抗体或第二抗体。

[0039] 在一些具体的实施方式中,细胞株为含有抗体对或其抗原结合片段基因库的大肠杆菌细胞株,具体的制备方法为:将上述核酸分子组建到表达载体上,得到抗体对或其抗原结合片段基因库,再将所得到的基因库经体外包装后感染大肠杆菌。

[0040] 本发明中,使用含有抗体对或其抗原结合片段基因库的大肠杆菌细胞株制备抗体对或其抗原结合片段,跳过了动物免疫的步骤,同时简化了传统杂交瘤技术中的细胞操作步骤,扩大了筛选的容量,可提高抗体对或其抗原结合片段制备的效率。

[0041] 本发明还提供制备上述抗体对或其抗原结合片段的方法,该方法包括:在合适的条件下培养上述细胞株,从细胞培养物中回收单克隆抗体对或其抗原结合片段。

[0042] 在一些具体的实施方式中,单克隆抗体对或其抗原结合片段的制备具体可以是,采用重组DNA技术得到氨基酸序列如SEQ ID NO:25的重组犬冠状病毒N蛋白,使用该重组犬冠状病毒N蛋白免疫小鼠得到免疫脾细胞,采用杂交瘤技术制备得到杂交瘤细胞,杂交瘤细胞分泌表达第一抗原或第二抗原。

[0043] 在一些具体的实施方式中,单克隆抗体对或其抗原结合片段的制备具体可以是,采用重组DNA技术得到氨基酸序列如SEQ ID NO:25的重组犬冠状病毒N蛋白,使用该重组犬冠状病毒N蛋白免疫小鼠得到免疫脾细胞,采用RT-PCR技术从免疫脾细胞中克隆出抗体的基因,并将基因组建到表达载体上得到基因库,后转染受体细胞,受体细胞分泌第一抗原或其抗原结合片段、或第二抗原或其抗原结合片段。

[0044] 本发明提供的试剂盒中,包括上述的抗体对或其抗原结合片段。在本发明中,采用上述的抗体对或其抗原结合片段作为检测物质,可以利用但不限于使用酶联免疫吸附法、酶免疫检测法、化学发光免疫检测法、放射免疫检测法、荧光免疫检测法、免疫色谱法和竞争法中的一种或多种,对样品中的犬冠状病毒和/或犬冠状病毒N蛋白进行定性和/或定量检测。

[0045] 在一些具体的实施方式中,根据检测所使用的方法,第一抗体或其抗原结合片段上还包括可检测的标记,该可检测的标记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。

[0046] 在一些具体的实施方式中,根据检测所使用的方法,第二抗体或其抗原结合片段上还包括可检测的标记,该可检测的标记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。

[0047] 本发明中,荧光染料可以是但不限于荧光素类荧光染料、罗丹明类荧光染料、花菁素类荧光染料或香豆素类荧光染料中的一种或多种。

[0048] 本发明中,酶可以是但不限于辣根过氧化物酶和/或碱性磷酸酶,结组酶对底物的特异性催化作用,生成有色的不溶性产物或者是具有一定电子密度的颗粒,在实际检测中,可通过肉眼、显微镜或分光光度计进行观察或测定。

[0049] 在一些具体的实施方式中,以第一抗体或其抗原结合片段作为捕获抗体、第二抗体或其抗原结合片段作为标记抗体,利用双抗体夹法对犬冠状病毒或其N蛋白或N蛋白的RDB进行检测;具体的,第二抗体或其抗原结合片段首先与犬冠状病毒或其N蛋白或N蛋白的RDB进行结合得到复合体,复合体与第一抗体或其抗原结合片段进行结合,并通过可检测

的标记进行检测,实现对犬冠状病毒或其N蛋白或N蛋白的RDB的定性和/或定量检测。

[0050] 本发明提供了上述抗体或其抗原结合片段、核酸分子、细胞株或试剂盒在非诊断目的的犬冠状病毒检测中的应用,能够实现对犬冠状病毒的快速、简便、成本低、灵敏度高以及特异性强的检测。

[0051] 本发明中涉及的氨基酸和核苷酸序列如表1所示:

[0052] 表1.

[0053]

名称	编号	序列信息
3A5 抗体 VH CDR1	SEQ ID NO:1	GFSLSTSGYV
3A5 抗体 VH CDR2	SEQ ID NO:2	IWGDGRK
3A5 抗体 VH CDR3	SEQ ID NO:3	AICFWDYFDY
3A5 抗体 VL CDR1	SEQ ID NO:4	QSVSTSSYSY
3A5 抗体 VL CDR2	SEQ ID NO:5	FAS
3A5 抗体 VL CDR3	SEQ ID NO:6	QHSFSGPYT
1G4 抗体 VH CDR1	SEQ ID NO:7	GFSSFRNQNF
1G4 抗体 VH CDR2	SEQ ID NO:8	INSGGSST
1G4 抗体 VH CDR3	SEQ ID NO:9	ARLYYDY
1G4 抗体 VL CDR1	SEQ ID NO:10	QSVLKSTNQKSY
1G4 抗体 VL CDR2	SEQ ID NO:11	WAS
1G4 抗体 VL CDR3	SEQ ID NO:12	HQNGGSLT
3A5 抗体 VH	SEQ ID NO:13	DVQIQEAGPGLVKPSQSLTCTVTGFSLSTSGYVLTWVRQV PGKSLEQLIYIWGDGRKDYNVLSKSGVPDRFSKISINVQASLQ TDDTARYYCAICFWDYFDYWGQGTTLTVSS
3A5 抗体 VL	SEQ ID NO:14	DIVMTQSPASLAMS VGQKVTMSCKSSQSVSTSSYSYMHWYK QKLGQPPKLLIKFASNLESGVRLSITKDNSESSQVFLDFTLNIIH PVEEEDTATYYCQHSFSGPYTFGGGKLEIK
1G4 抗体 VH	SEQ ID NO:15	EVQLVESGGDLVKPGGSLNLSCAVSGFSSFRNQNFMSWRQ TPQGRLEELGMINSGGSTFYDPARFSGSVRDNAKSTLKMN

[0054]

		MSSLQSDDTAMYCARLYDYWGQGTTLTVSS
1G4 抗体 VL	SEQ ID NO:16	NILMTQSPASLAVTAGEKVTMTCKSSQSVLKSTNQKSYLAEY QQRAGQSPPLLIYWASTRESGVPKGRFTISDGTVDVNGTYLQQ PEDLAVYYCHQNGGSLTFGAGTKLELK
3A5 抗体 CH	SEQ ID NO:17	AKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNV AHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTQPRE EQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKRCRVNSAAFPAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYTIPTPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV EWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEA GNTFTCSVLHEGLNHHTEKSLSHSPGK
3A5 抗体 CL	SEQ ID NO:18	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNS YTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
1G4 抗体 CH	SEQ ID NO:19	AKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNV AHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTQPRE EQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKRCRVNSAAFPAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYTIPTPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV EWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEA GNTFTCSVLHEGLNHHTEKSLSHSPGK
1G4 抗体 CL	SEQ ID NO:20	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNS YTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
3A5 抗体 ntVH	SEQ ID NO:21	GACGTGCAGATCCAGGAGGCCGGCCCCGGCCTGGTGAAGC CCAGCCAGAGCCTGAGCCTGACCTGACCGTGACCGGCTT CAGCCTGAGCACCAGCGGCTACGTGCTGACCTGGGTGAGG CAGGTGCCCGGCAAGAGCCTGGAGCAGCTGATCTACATCT GGGGCGACGGCAGGAAGGACTACAACAGCGTGCTGAAGA GCGGCGTGCCCGACAGGTTACAGCAAGAGCATCAGCAACGT GCAGGCCAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCAGGTACTAC TGCGCCATCTGCTTCTGGGACTACTTCGACTACTGGGGCCA GGGCACCACCCTGACCGTGAGCAGC
3A5 抗体 ntVL	SEQ ID NO:22	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCAGCCTGGCCATGA GCGTGGGCCAGAAGGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCC AGAGCGTGAGCACCAGCAGCTACAGCTACATGACTGGTA CAAGCAGAAGCTGGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCAAG TTCGCCAGCAACCTGGAGAGCGGCGTGAGGCTGAGCATCA CCAAGGACAACAGCGAGAGCAGCCAGGTGTTCTGGACTT CACCTGAACATCCACCCCGTGAGGAGGAGGACACCGCC ACCTACTACTGCCAGCACAGCTTCAGCGGCCCTACACCTT CGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
1G4 抗体 ntVH	SEQ ID NO:23	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCAGCTGGTGAAG CCCGGCGGCAGCCTGAACCTGAGCTGCGCCGTGAGCGGCT

		<p>TCAGCAGCTTCAGGAACCAGCAGAACTTCATGAGCTGGAG GCAGACCCCCAGGGCAGGCTGGAGGAGCTGGGCATGATC AACAGCGGGCAGCAGCACCTTCTACCCCGACCCCGCCA GGTTCAGCGGCAGCGTGAGGGACAACGCCAAGAGCACCT GAAGATGAACATGAGCAGCCTGCAGAGCGACACCCGC CATGTACTACTGCGCCAGGCTGTACTACGACTACTGGGGC CAGGGCACCACCCTGACCGTGAGCAGC</p>
<p>[0055] 1G4 抗体 ntVL</p>	<p>SEQ ID NO:24</p>	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGACTGGTGAAG CCCGGCGGCAGCCTGAACCTGAGCTGCGCCGTGAGCCAGA GCGTGCTGAAGAGCACCAACCAGAAGAGCTACCTGGCCGA GTACCAGCAGAGGGCCGCGCAGAGCCCCCTGCTGATC TACTGGGCCAGCACCCAGGGAGAGCGGCGTGCCCAAGGGC AGGTTACCATCAGCGACGGCACCGACGTGAACGGCACCT ACCTGCAGCAGCCCGAGGACCTGGCCGTGTACTACTGCCA CCAGAACGGCGGCAGCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAG CTGGAGCTGAAG</p>
<p>重组犬冠状病毒 N 蛋白</p>	<p>SEQ ID NO:25</p>	<p>MANQQRVSWGDESTKRRGRSRSRGRKNNNIPLSFFDPITLQ QGAKFWNLCPRDFVPKGIGNKDQQIGYWNQTRYRMVKGQ RKELPERWFFYYLGTGPHADAKFKDKLDGVFWVAKDGMN KPTTLGNRGANNESKALKFDGKVPSEFQLEVNQSRDNRSRRS QSRQSRNRSQSRGRQSNKDDSVQAVLAALKKLGVDV EKQQRSRSKSKERSNSKTRDTPKNENKHTWKRTAGKGDV TKFYGARSSANFGDSLVAANGSAGHYPLAECVPSVSSIL FGSYWTAKEDGDQIEVTFTHKYHLPKDDPKTGQFLQINAY ARPSEVAKEQRQRKARSKSAERSEQEVVPDALTENYTDVFD DTQVEIIDEVTN</p>

[0056] 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。

[0057] 本发明中实施例中所涉及的细胞、试剂及其来源具体如下所示:

- [0058] 弗氏完全佐剂(sigma公司,货号为F5881);
- [0059] 弗氏不完全佐剂(sigma公司,货号为F5506);
- [0060] 骨髓瘤细胞(ATCC,货号为BNCC100908);
- [0061] 1640培养基(VivaCell,货号为C3010-0500);
- [0062] PEG1500(罗氏,货号为10783641001);
- [0063] 胎牛血清FBS(四季青,货号为11011-8611);
- [0064] 细胞培养用青霉素-链霉素双抗(上海生工,货号为E607011-0100);
- [0065] HAT培养基添加剂(sigma公司,货号为H0262);
- [0066] HRP标记羊抗鼠二抗(厦门泰京,货号为TJ-211229CN);
- [0067] HT培养基添加剂(sigma公司,货号为H0137);
- [0068] 腹水专用佐剂(北京博奥龙,货号KX0210048);
- [0069] Protein A柱(博格隆生物,货号为AA301307);
- [0070] 辣根过氧化物酶(瑞思试剂,货号为RS20220118);
- [0071] DNP抗体(Merck公司,货号为D9781-2ML);

[0072] 犬冠状病毒单抗5B1(珠海博美生物科技有限公司,货号为M0495-2546);

[0073] 犬冠状病毒单抗13H5(珠海博美生物科技有限公司,货号为M0494-1937)。

[0074] 实施例1.

[0075] 本实施例中提供了能分泌抗犬冠状病毒N蛋白抗体的细胞株的制备方法,该方法包括动物免疫、细胞免疫、阳性杂交瘤细胞的筛选以及阳性杂交瘤细胞的克隆化等步骤,具体如下所示:

[0076] 1、动物免疫

[0077] 在动物免疫中,以8周龄BALB/C雌鼠作为免疫对象,采用包括氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的重组犬冠状病毒N蛋白作为抗原;

[0078] (1)免疫原的制备:

[0079] 将大肠杆菌重组表达的新型冠状病毒N蛋白与弗氏完全佐剂等体积混合,制得第一免疫原;将大肠杆菌重组表达的新型冠状病毒N蛋白与等体积混合,制得第二免疫原;将大肠杆菌重组表达的新型冠状病毒N蛋白与生理盐水等体积混合,制得第三免疫原。

[0080] (2)免疫过程:第一次免疫:在BALB/C雌鼠背部皮下分3-4点注射50 μ g第一免疫原;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第二免疫原;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;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第三免疫原;24h后进行第五次免疫,在BALB/C雌鼠尾静脉注射50 μ g第三免疫原。

[0081] 2、细胞免疫

[0082] BALB/C雌鼠第五次免疫后的第三天开始细胞免疫,细胞免疫的过程具体包括以下步骤:

[0083] (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;

[0084] (2)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;

[0085] (3)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;

[0086] (4)细胞融合过程: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;

[0087] 用手指轻弹离心管底部,使两种细胞松散混匀,置于装有37 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C、5%CO₂的细胞培养箱中培养;

[0088] 其中,配制500ml HAT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(100 \times)、10mL的HAT培养基添加剂(50 \times)以及385mL的1640培养基。

[0089] 3、阳性杂交瘤细胞的筛选

[0090] 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,具体包括以下步骤:

[0091] (1) 包板:利用大肠杆菌重组表达的新型冠状病毒N蛋白作为包被抗原,用pH值为9.6的0.05mol/L CB缓冲液(Na_2CO_3 31.8g, NaHCO_3 58.8g,超纯水补足至2L)稀释至2 $\mu\text{g}/\text{ml}$,以100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入酶标板,4 $^\circ\text{C}$ 包被过夜后拍干,用质量体积比为1%的明胶-PBS缓冲液封闭,300 $\mu\text{L}/\text{孔}$,4 $^\circ\text{C}$ 封闭过夜后拍干备用。

[0092] (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100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入酶标板,放置37 $^\circ\text{C}$ 孵育60min后,用含Tween-20的0.01mol/LPBST缓冲液洗涤并拍干,加入100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的HRP标记羊抗鼠二抗,放置37 $^\circ\text{C}$ 孵育60min后洗涤并拍干,加入100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的TMB显色液,放置37 $^\circ\text{C}$ 避光显色10min,加入50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的1mol/L HCl终止反应。

[0093] 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。

[0094] 4、阳性杂交瘤细胞的克隆化

[0095] 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。

[0096] 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 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 湿润培养7~10天,出现肉眼可见的克隆细胞,即可检测抗体。

[0097] 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。

[0098] 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12株单抗杂交瘤细胞株,取上清进行下一步的功能筛选。对上述10株单抗杂交瘤细胞株进行命名,具体如表2所示。

[0099] 表2.

[0100]	细胞株	抗体	HRP-抗体偶联复合蛋白
--------	-----	----	--------------

[0101]	7E8 细胞株	7E8 抗体	HRP-7E8 抗体
	9B5 细胞株	9B5 抗体	HRP-9B5 抗体
	3A5 细胞株	3A5 抗体	HRP-3A5 抗体
	5B5 细胞株	5B5 抗体	HRP-5B5 抗体
	3H7 细胞株	3H7 抗体	HRP-3H7 抗体
	5D9 细胞株	5D9 抗体	HRP-5D9 抗体
	1G4 细胞株	1G4 抗体	HRP-1G4 抗体
	10H1 细胞株	10H1 抗体	HRP-10H1 抗体
	7D10 细胞株	7D10 抗体	HRP-7D10 抗体
	11B7 细胞株	11B7 抗体	HRP-11B7 抗体

[0102] 实施例2.

[0103] 本实施例中提供了抗体的制备方法,在该方法中利用实施例1得到的10株细胞株分别进行腹水的制备,并对腹水进行纯化得到抗体,具体包括以下步骤:

[0104] (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将表1所示的单抗杂交瘤细胞株(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。

[0105] (2) 腹水的纯化:将(1)中收集到的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,通过各细胞株制备得到的抗体命名如表2所示。

[0106] 实施例3.

[0107] 本实施例中对实施例2中的10株进行辣根过氧化物酶(HRP)标记,具体包括以下的步骤:

[0108] (1) 将纯化后的抗体用pH值为9.6的0.05mol/L CB缓冲液稀释至2mg/mL得到抗体蛋白溶液;并使用pH值为9.6的0.05mol/L CB缓冲液对透析膜进行浸泡处理2次,将1mL的抗体蛋白溶液转移至透析膜中,于4 $^{\circ}$ C下使用pH=9.6的0.05mol/L CB缓冲液进行搅拌透析,且每隔1h换液一次,共透析5次;

[0109] (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溶液按体积1:1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活化HRP 30min;

[0110] (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 HRP加入1 μ L乙二醇),继续4 $^{\circ}$ C避光30min,终止HRP活化;接着将终止活化的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值为9.6的0.05mol/L CB缓冲液中,4 $^{\circ}$ C避光偶联过夜;第二天继续更换pH值为9.6的0.05mol/L 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。

[0111] (4) 用纯水配制20mg/mL NaBH₄溶液加入到(3)中得到的抗体-HRP偶联液中,加入量为每1mg的HRP加入量为2 μ L的NaBH₄溶液,于4 $^{\circ}$ C下反应2h,且每0.5h上下颠倒混匀几下,获得偶联复合蛋白;接着使用50%硫酸铵(即等体积饱和浓度的硫酸铵与获得的偶联复合蛋白液1:1混合)沉淀偶联复合蛋白,于4 $^{\circ}$ C下沉淀15min,接着10000rpm离心10min,得到HRP-抗体偶联复合蛋白沉淀,HRP-抗体偶联复合蛋白的命名具体如表2所示。

[0112] 实施例4.

[0113] 本实施例中使用实施例2的10株抗体和实施例3的10株HRP-抗体偶联复合蛋白进行两两配对,采用双抗夹心ELISA法,筛选出能够特异性识别犬冠状病毒N蛋白不同表位的抗体。

[0114] 其中,双抗夹心ELISA法中以抗体作为捕获抗体、HRP-抗体偶联复合蛋白作为标记抗体,具体步骤为:将10株抗体作为捕获抗体分别包被在酶标板上,然后向酶标板的孔中加入新型冠状病毒N蛋白,孵育后洗去未结合的新型冠状病毒N蛋白;接着分别加入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,并利用分光光度计在280nm波长下测定吸光度,检测结果如表3所示。

[0115] 表3.

[0116] 捕获 抗体	检测结果										
	标记抗体 (HRP-抗体类型)										
	7E8	9B5	3A5	5B5	3H7	5D9	1G4	10H1	7D10	11B7	
	7E8	0.0923	0.2707	0.2309	0.2076	0.4625	0.1882	0.2086	0.4049	0.3032	0.2961
	9B5	0.2088	0.0977	0.2671	0.1802	0.3852	0.2408	0.4755	0.1237	0.1300	0.1567
	3A5	0.3474	0.5361	0.1001	0.4452	0.4992	0.1144	2.4945	1.0155	0.1231	0.1916
	5B5	0.3255	0.6780	0.5229	0.1087	0.4973	0.5821	1.1255	0.2809	0.1426	1.1356
[0117]	3H7	0.1491	0.2793	0.2718	0.3031	0.1054	0.9938	0.9210	0.2905	0.1298	0.1091
	5D9	0.1392	0.2401	0.2687	2.1909	0.2498	0.0968	1.2619	0.2964	1.8244	0.0945
	1G4	0.1514	0.8656	2.3094	0.7523	0.2778	1.1816	0.2889	1.2320	1.2143	0.1250
	10H1	0.1316	0.6638	0.2557	0.5556	0.2559	0.7829	0.8550	0.0959	0.5834	0.1134
	7D10	0.2691	0.3767	0.3873	0.3606	0.4779	0.1975	1.2648	1.1691	0.1198	0.1031
	11B7	0.1845	0.2628	0.2533	0.2275	0.3103	0.5554	0.6697	0.4069	1.1126	0.0981

[0118] 由测试结果可知,3A5和1G4这一对抗体对具有高效价,可应用于犬冠状病毒及其N蛋白或N蛋白的RDB的定性和/或定量检测中。

[0119] 实施例5.

[0120] 在本实施例中,扩大培养实施例1中的制备得到的3A5细胞株和1G4细胞株,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。测序结果表4所示。

[0121] 表4.

[0122]	3A5 细胞株	3A5 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
	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	
1G4 细胞株	1G4 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	

[0123] 实施例6.

[0124] 本实施例所提供的试剂盒包括胶体金层析纸条,该胶体金层析纸条以3A5抗体作为捕获抗体、以1G4抗体作为标记抗体,通过以下的步骤进行制备:

[0125] S1、检测垫的制备: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、25g的蔗糖,溶于1000mL超纯水中,配制得到包被缓冲液;取1mg/mL的3A5抗体,按1.2 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的喷涂量对硝酸纤维膜进行喷涂,得到长度为30cm的检测线;取1mg/mL的DNP抗体,按1.2 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的喷涂量对硝酸纤维膜进行喷涂,得到长度为30cm的质控线,且质控线和检测线的距离为5mm;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 $24 \pm 2\text{h}$ 。

[0126] S2、金标结合物的标记:称取0.36g的Tris、1g的BSA、100 μL 的吐温-20、2g的蔗糖、100 μL 的proclin300溶于100mL超纯水中,得到复溶液;取100mL的0.01%胶体金溶液置于干净的容器中,加入1~3mL浓度为0.2M的 K_2CO_3 溶液搅拌均匀,接着加入500 μg ~1500 μg 的1G4抗体,搅拌反应15min,加入1000 μL 的20% BSA溶液进行搅拌,封闭10min后,8000~10000r/min离心20min后,弃上清,采用复溶液复溶沉淀,得到标记好的标记抗体,置于4℃下保存备用。

[0127] S3、结合垫的制备:称取0.362g的Tris、0.3g的酪蛋白钠、0.2g的PEG20000、100 μL 的吐温-20、3g的蔗糖、100 μL 的proclin300溶于100mL超纯水中,得到金标结合物溶液;将一定量的标记抗体加入金标结合物溶液,混合均匀,溶液中标记抗体的浓度为15wt%,按照35mL/张的涂布量将上述溶液均匀涂布于玻璃纤维膜上,置于50℃的烘箱中干燥24h,得到结合垫。

[0128] S4、样品垫的制备: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、25g的蔗糖、5g的BSA,1mL的proclin300溶于1000mL超纯水中,得到样本垫处理液;按每板32mL样本垫处理液,均匀涂布在玻璃纤维膜(25cm \times 30cm),置于50℃的烘箱中干燥 $24 \pm 2\text{h}$,得到样品垫。

[0129] S5、金标纸条的组装:在温度为18~28℃、湿度为10~30%的条件下,依次将样本垫、结合垫粘贴在PVC板靠近检测线的一端,且样本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,

组成大板后,按照宽度3mm裁剪成细条,得到胶体金层析纸条,且为了便于后续检测的使用,将组装好的胶体金层析纸条安装于试纸卡外壳内。

[0130] 实施例7.

[0131] 本实施例提供了一种试剂盒,按照实施例6提供的方法制备胶体金层析纸条,不同之处在于,在胶体金层析纸条中以1G4抗体作为捕获抗体、3A5抗体作为标记抗体,其他条件相同。

[0132] 对比例.

[0133] 本对比例提供了一种试剂盒,按照实施例6提供的方法制备胶体金层析纸条,不同之处在于,在胶体金层析纸条中以犬冠状病毒单抗5B1作为捕获抗体、犬冠状病毒单抗13H5作为标记抗体,其他条件相同。

[0134] 测试例.

[0135] 对实施例6和实施例7提供的胶体金层析纸条进行敏感性和特异性测试,并以对比例作为对照,具体如下所示:

[0136] (1) 敏感性测试:使用稀释液对不同浓度的灭活犬冠状病毒进行检测(稀释液成分:10mM PBS,0.3%PVP40),测试结果如表5所示。

[0137] 表5.敏感性测试结果

稀释倍数	实施例6	实施例7	对比例
100倍	强阳性	强阳性	中阳性
500倍	中阳性	中阳性	弱阳性
1000倍	中阳性	中阳性	弱阳性
5000倍	弱阳性	弱阳性	阴性
10000倍	弱阳性	阴性	阴性
20000倍	弱阳性	阴性	阴性
稀释液	阴性	阴性	阴性

[0139] 由图1和表5可知,当病毒液被稀释到20000倍时,实施例6中提供的胶体金层析纸条的检测结果仍呈阳性;由图2和表5可知,当病毒液被稀释到5000倍时,实施例7中提供的胶体金层析纸条检测结果仍呈阳性;而由图3和表5可知,当病毒液被稀释到5000倍时,对比例中提供的胶体金层析纸条无法检测出溶液中的犬冠状病毒呈阴性,即实施例6和7中使用的1G4抗体和3A5抗体这一对抗体相较于现有技术中常使用的抗体对而言,对于犬冠状病毒具有更高的敏感度;并且,当抗体对中以3A5抗体作为捕获抗体、以1G4抗体作为标记抗体时,抗体对能够协同发挥最佳的作用,能检测出被稀释到20000倍的病毒液中的犬冠状病毒,具有更高的检测灵敏性。

[0140] (2) 特异性检测:对灭活犬冠状病毒液、重组N蛋白、猫冠状病毒液、猪传染性胃肠炎病毒液、犬细小病毒液、轮状病毒液、犬布鲁氏杆菌液、链球菌液、大肠埃希菌液、Vero细胞裂解液、新生牛血清、MEM培养基、1%BSA以及1%脱脂奶粉进行检测,测试结果如表6所示。

[0141] 表6.特异性检测结果

检测物质	实施例6	实施例7	对比例
灭活犬冠状病毒液	强阳	强阳	中阳

重组N蛋白	强阳	强阳	中阳
猫冠状病毒液	阴性	阴性	阴性
猪传染性胃肠炎病毒液	阴性	阴性	阴性
犬细小病毒液	阴性	阴性	阴性
轮状病毒液	阴性	阴性	阴性
犬布鲁氏杆菌液	阴性	阴性	阴性
链球菌液	阴性	阴性	阴性
大肠埃希菌液	阴性	阴性	阴性
Vero细胞裂解液	阴性	阴性	阴性
新生牛血清	阴性	阴性	弱阳
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

[0143] 由检测结果可知,实施例6和7中所提供的胶体金层析纸条对灭活犬冠状病毒液、重组N蛋白的检测结果显示强阳性,而对其他物质的检测结果呈现阴性,相较于对比例提供的单克隆抗体对于新生牛血清的检测结果显示弱阳性而言,本发明实施例6和7中所提供的1G4抗体和3A5抗体这一对抗体对于犬冠状病毒具有更高的检测特异性,将其应用于实际的非诊断目的的犬冠状病毒检测中时,具有更高的检测精度和效率。

[0144] 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。

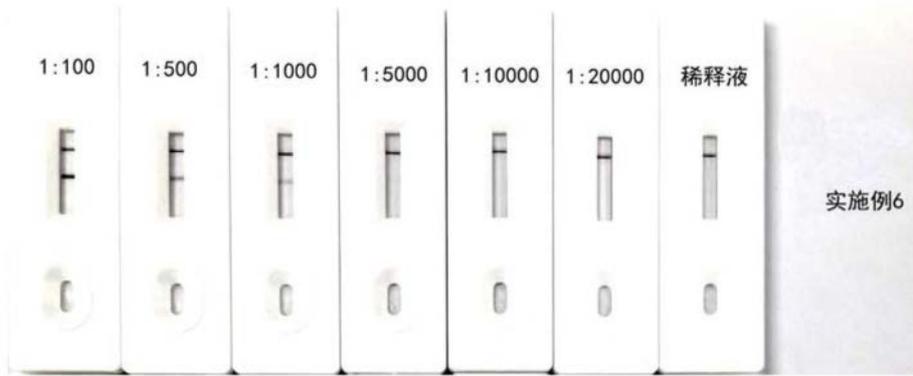


图1

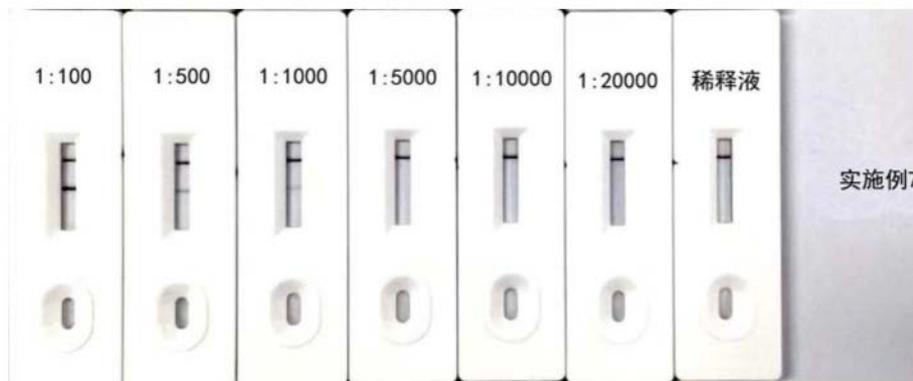


图2

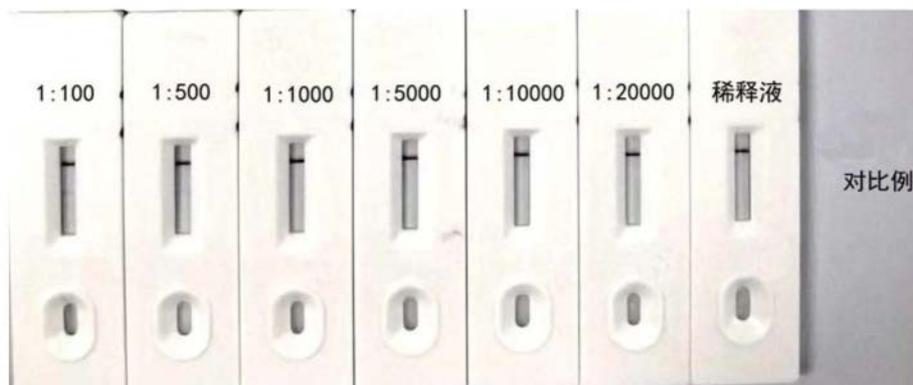


图3