



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116444662 A

(43) 申请公布日 2023.07.18

(21) 申请号 202310244290.3

G01N 33/577 (2006.01)

(22) 申请日 2023.03.14

(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

(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.

C07K 16/10 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

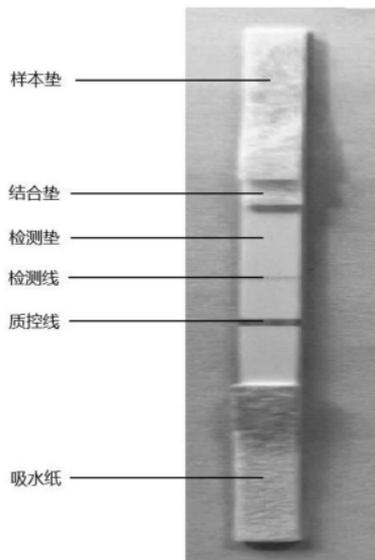
权利要求书1页 说明书15页  
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

抗犬瘟热病毒N蛋白的单克隆抗体对和核酸分子、细胞及制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于免疫学领域和分子病毒学的技术领域,公开了一种抗犬瘟热病毒N蛋白的单克隆抗体对和核酸分子、细胞及制备方法和应用。一种单克隆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。本发明提供的单克隆抗体对具有高效价,均与犬瘟热病毒N蛋白具有强结合能力,能够不受其他病毒及药物的干扰,实现对犬瘟热病毒的高特异性和高灵敏度检测。



1. 一种单克隆抗体对或其抗原结合片段,其特征在於,所述单克隆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所述的单克隆抗体对或其抗原结合片段,其特征在於,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所述的单克隆抗体对或其抗原结合片段,其特征在於,所述第一抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb和互补决定区片段、单链抗体、嵌合抗体和多特异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自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb和互补决定区片段、单链抗体、嵌合抗体和多特异抗体中的一种或多种。

4. 一种核酸分子,其特征在於,所述核酸分子编码权利要求1~3任一所述的单克隆抗体对或其抗原结合片段。

5. 一种能分泌权利要求1~3任一所述的单克隆抗体对或其抗原结合片段的细胞,其特征在於,包括权利要求4所述的核酸分子。

6. 一种制备权利要求1~3任一所述的单克隆抗体对或其抗原结合片段的方法,其特征在於,该方法包括:在合适的条件下培养权利要求5所述的细胞,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,其特征在於,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所示和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所示和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。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在於,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,其特征在於,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任一所述的单克隆抗体对或其抗原结合片段、权利要求4所述的核酸分子和/或权利要求7~9任一所述的试剂盒在非诊断目的的犬瘟热病毒检测中的应用。

## 抗犬瘟热病毒N蛋白的单克隆抗体对和核酸分子、细胞及制备方法 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,尤其涉及一种抗犬瘟热病毒N蛋白的单克隆抗体对和核酸分子、细胞及制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 犬瘟热(CD)是由犬瘟热病毒(CDV)感染犬科动物引起的严重系统性疾病,主要临床表现主要为发热、卡他性呼吸道症状、胃肠疾病、皮疹和中枢神经系统疾病。CD最初被认为是一种犬科动物易感的传染性疾病,但近些年来关于鼬科、浣熊科、鬣狗科、熊猫科、灵长目猕猴科、偶蹄目猪科、鳍足目海豹科以及鲸目海豚科等动物发病的报道不断增多,且有证据表面CDV可跨宿主种属传播,其感染谱系呈不断扩大的趋势,所造成的危害也越来越大。因此,开发特异、快速和灵敏的检测技术,进行CDV早期检测具有重大的意义。

[0003] CDV属于副粘病毒科麻疹病毒属,为有囊膜包裹的、单股、不分节段的负链RNA病毒,全长15~16kb,其基因组主要编码核衣壳蛋白(N蛋白)、血凝素(H蛋白)、融合蛋白(F蛋白)、磷蛋白(P蛋白)、大蛋白(L蛋白以及基质蛋白(M蛋白);其中,与其他蛋白相比,N蛋白的编码基因变异性小,在病毒复制过程中起重要作用,且能够引起机体体液免疫和细胞免疫反应,可作为CDV免疫学检测中的目标抗原使用。

[0004] 目前,CDV免疫学检测技术主要包括琼脂扩散法、酶联免疫吸附法、血清中和法、免疫荧光法、免疫组织化学法以及胶体金免疫层析法等方法。上述方法均需要一种与N蛋白具有良好结合能力的抗体作为检测物质,检测样品中是否存在犬瘟热病毒N蛋白;但是,现有技术中所使用到的抗体存在着特异性较低或灵敏度低的问题,这将导致假阳性或假阴性检测结果的出现。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是为了获得一种具有优异特异性和灵敏度的犬瘟热病毒N蛋白,实现对犬瘟热病毒的高特异性和高灵敏度检测,提供了一种抗犬瘟热病毒N蛋白的单克隆抗体对和核酸分子、细胞及制备方法和应用。

[0006] 第一方面,本发明提供的单克隆抗体对或其抗原结合片段采用以下的技术方案:

[0007] 一种单克隆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轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示、重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轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示、重链可变区的氨基

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'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb和互补决定区片段、单链抗体、嵌合抗体和多特异抗体中的一种或多种。

[0010] 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选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb和互补决定区片段、单链抗体、嵌合抗体和多特异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单克隆抗体对或其抗原结合片段。

[0012] 第三方面,本发明提供了能分泌上述单克隆抗体对或其抗原结合片段的细胞,该细胞包括上述核酸分子。

[0013] 第四方面,本发明提供了制备上述单克隆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的细胞,从细胞培养物中回收单克隆抗体对或其抗原结合片段。

[0014] 第四方面,本发明提供的试剂盒采用以下的技术方案:

[0015] 一种试剂盒,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所示和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;

[0016] 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所示和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。

[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] 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。

[0019] 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。

[0020] 第五方面,本发明提供了上述单克隆抗体对或其抗原结合片段、核酸分子和/或试剂盒在非诊断目的的犬瘟热病毒检测中的应用。

[0021] 有益效果:

[0022] 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瘟热病毒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,犬瘟热病毒N蛋白与第二抗体或其抗原结合片段进行结合后空间结构发生改变,使得第一抗体或其抗原结合片段与犬瘟热病毒N蛋白具有更加良好的结合能力,能够不受其他疾病病毒株及药物的交叉干扰,实现对犬瘟热病毒N蛋白的高特异性和高灵敏度检测。

## 附图说明

[0023] 图1为本发明实施例2中提供的胶体金层析纸条的结构示意图;

[0024] 图2为本发明测试例2中实施例2提供的胶体金层析纸条对不同稀释倍数的灭活犬瘟热病毒液进行检测的实验结果图;

[0025] 图3为测试例2中实施例3提供的胶体金层析纸条对不同稀释倍数的灭活犬瘟热病

毒液进行检测的实验结果图；

[0026] 图4为测试例2中对比例1提供的胶体金层析纸条对不同稀释倍数的灭活犬瘟热病毒液进行检测的实验结果图。

### 具体实施方式

[0027] 本发明提供的单克隆抗体对或其抗原结合片段中,包括了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。

[0028] 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瘟热病毒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瘟热病毒N蛋白上的抗原决定簇。

[0029] 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。

[0030] 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瘟热病毒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瘟热病毒N蛋白上的另一抗原决定簇的。

[0031] 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。

[0032] 在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中,所指的抗原结合片段为具有与犬瘟热病毒N蛋白特异性结合能力的多肽,可通过重组DNA技术或通过完整第一抗体或第二抗体的酶促或化学断裂制备得到。

[0033] 在一些具体的实施方式中,第一抗体及其抗原结合片段可以是但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb和互补决定区片段、单链抗体、嵌合抗体和多特异抗体中的一种或多种。

[0034] 在一些具体的实施方式中,第二抗体及其抗原结合片段可以是但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb和互补决定区片段、单链抗体、嵌合抗体和多特异抗体中的一种或多种。

[0035] 本发明中,Fv指的是小分子的基因工程抗体,具体为通过短肽将重链可变区和轻链可变区连接而成;Fab指的是抗体分子经过木瓜蛋白酶水解之后得到的具有抗原结合能力的片段,具体为重链可变区和轻链可变区通过S-S键联得到的片段;F(ab')<sub>2</sub>指的是抗体分子经过胃蛋白酶水解得到的大分子片段,具体为两个Fab通过重链可变区之间的S-S键联得到的片段,具有双价抗体活性,能够与两个相应的重组犬瘟热病毒N蛋白的抗原决定簇结合。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 本发明中不限制核酸分子产生的方式,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。

[0040] 本发明提供的细胞中包括上述的核酸分子,其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。

[0041] 本发明中,细胞可以通过免疫反应得到的能分泌第一抗体或第二抗体的浆细胞,也可以是采用杂交瘤技术得到的分泌第一抗体或第二抗体的杂交瘤细胞,还可以是采用基因工程技术得到的能分泌第一抗体或其抗原结合片段、或第二抗体或其抗原结合片段的细胞。

[0042] 本发明提供的上述单克隆抗体对或其抗原结合片段的制备方法具体为:在合适的条件下培养上述细胞,从细胞培养物中回收单克隆抗体对或其抗原结合片段。

[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的重组犬瘟热病毒N蛋白,使用该重组犬瘟热病毒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。

[0044] 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的重组犬瘟热病毒N蛋白,使用该重组犬瘟热病毒N蛋白免疫小鼠得到免疫脾细胞,采用DNA提取技术提取免疫脾细胞中的编码合成单克隆抗体对或其抗原结合片段的核酸分子,采用基因工程技术转化受体细胞,受体细胞分泌表达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。

[0045] 本发明中,以上制备方法中所使用到的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤等均为相应领域内广泛使用的常规步骤。

[0046] 本发明提供的试剂盒中,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所示和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;

[0047] 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所示和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。

[0048] 本发明所提供的试剂盒以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作为检测试剂,并利用酶联免疫吸附法、酶免疫检测、化学发光免疫检测、放射免疫检测、荧光免疫检测、免疫色谱或竞争法等方法,检测犬瘟热病毒或其N蛋白或N蛋白的RDB在样品中的存在或其水平。

[0049] 具体的,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、发光物质、有色物质和酶中的一种或多种。

[0050] 具体的,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。

[0051] 本发明中,可使用放射性同位素<sup>125</sup>I,采用氯胺T(N-氯代苯磺胺)法或Indogen包被

试管法对第一抗体或其抗原结合片段、第二抗体或其抗原结合片段进行标记。

[0052] 本发明中,荧光染料选自荧光素类荧光染料、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,具体的可以是但不限于异硫氰酸荧光素、四甲基异硫氰酸罗丹明和藻红蛋白中的一种或多种。

[0053] 本发明中,用于标记第一抗体或其抗原结合片段、第二抗体或其抗原结合片段的酶可以是但不限于辣根过氧化物酶和/或碱性磷酸酶。

[0054] 在一些具体的实施方式提供的试剂盒中,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瘟热病毒或其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瘟热病毒或其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,并通过可对检测的标记进行检测,实现对犬瘟热病毒或其N蛋白或N蛋白的RDB的定性和/或定量检测。

[0055] 其中,由于第二抗体或其抗原结合片段首先与犬瘟热病毒或其N蛋白或N蛋白的RDB进行结合时,犬瘟热病毒或其N蛋白或N蛋白的RDB的空间构象发现变化,使得第一抗体或其抗原结合片段与犬瘟热病毒或其N蛋白或N蛋白的RDB具有更加优秀的结合能力,最终实现对于犬瘟热病毒或其N蛋白或N蛋白的RDB的高特异性和高灵敏度检测。

[0056] 本发明提供的应用中,使用上述单克隆抗体对或其抗原结合片段、核酸分子和/或试剂盒犬瘟热病毒进行检测,相较于使用其他的犬瘟热病毒N蛋白的单克隆抗体,具有更高的灵敏度和特异性。

[0057] 本发明中涉及的氨基酸、核苷酸序列如表1所示:

[0058] 表1.

[0059]

名称	编号	序列信息
12F11 抗体 VH CDR1	SEQ ID NO:1	GYTSTSDQYA
12F11 抗体 VH CDR2	SEQ ID NO:2	ITYSGST
12F11 抗体 VH CDR3	SEQ ID NO:3	ATLGGYHYAMDS
12F11 抗体 VL CDR1	SEQ ID NO:4	QSLVNSYTSSG
12F11 抗体 VL CDR2	SEQ ID NO:5	FAS
12F11 抗体 VL CDR3	SEQ ID NO:6	QQHFDNPTPFT
8B5 抗体 VH CDR1	SEQ ID NO:7	GFSLTSSG
8B5 抗体 VH CDR2	SEQ ID NO:8	IWGDGRT
8B5 抗体 VH CDR3	SEQ ID NO:9	ARDRWYG YLDY
8B5 抗体 VL CDR1	SEQ ID NO:10	QSLVSTSSYQQNF
8B5 抗体 VL CDR2	SEQ ID NO:11	YAS
8B5 抗体 VL CDR3	SEQ ID NO:12	QHSNQLGLYT
12F11 抗体 VH	SEQ ID NO:13	QVQLVESGPGLVKPSQSL SITCTVSGYTSTSDQYAW NWIRQFPGNKLEWLG MITYSGSTSYHPPARFRGTRD TSKNQLQPPVEEVTDDTATYYCATLGGYHYAMDS FGGASVTVSS
12F11 抗体 VL	SEQ ID NO:14	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSLVNSYTSSG LAWYYQKQGQAPQLMG SFASTRESSLKSRSIIGGGS GTDGSDNDFTLTEFFLQLEDLADYFCQQHFDNPTPF TGQGGTKLEIK
8B5 抗体 VH	SEQ ID NO:15	EVQLKESGGDLVAPSGSLNLSCAVSGFSLTSSGVNW YQQPPGQGLEWVATI WGDGR TDYNSPLITKDSGSG TDFKNQVFLDTNVHSDDTARYFCARDRWYGYLDY FGSGTTVTVSS
8B5 抗体 VL	SEQ ID NO:16	NILMLQSPASLAVTAGEKVTMTCKSSQSLVSTSSYQ QNFHWRQKPGKSPKLIYYASSVESGVKSRLSSGS GTDFTLNIHTLNAEKMTSDTATYYCQHSNQLGLYT WGQGTKLEIK
12F11 抗体 CH	SEQ ID NO:17	AKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLGCLVKGYFPEP VTVTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTVPS TWPSETVTCNVAHPASSTKVDK KIVPRDCGCKPCIC TVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDD PEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSEL PIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGR

[0060]

		PKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV EWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQ KSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKLSLHSPGK
12F11 抗体 CL	SEQ ID NO:18	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDI NVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
8B5 抗体 CH	SEQ ID NO:19	AKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEP VTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSS TWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCIC TVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDD PEVQFSWFVDDDEVHTAQTQPREEQFNSTFRSSEL PIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGR PKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV EWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQ KSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKLSLHSPGK
8B5 抗体 CL	SEQ ID NO:20	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDI NVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
12F11 抗体 ntVH	SEQ ID NO:21	CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCCCGGCTGG TGAAGCCCAGCCAGAGCCTGAGCATCACCTGCAC CGTGAGCGGCTACACCAGCACCAGCGACCAGTAC GCCTGGAAGTGGATCAGGCAGTTCCTCCGGCAACA AGCTGGAGTGGCTGGGCATGATCACCTACAGCGG CAGCACCAGCTACCACCCCCCGCCAGGTTTCAGG GGCACCAGGGACACCAGCAAGAACCAGCTGCAGC CCCCCGTGGAGGAGGTGACCACCGACGACCCGC CACCTACTACTGCGCCACCCTGGGCGGCTACCACT ACGCCATGGACAGCTTCGGCGGCGCCAGCGTGAC CGTGAGCAGC
12F11 抗体 ntVL	SEQ ID NO:22	GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGCCAGCCTGG CCGTGAGCCTGGGCCAGAGGGCCACCATCAGCTG CAGGGCCAGCCAGAGCCTGGTGAACAGCTACACC AGCAGCGGCCTGGCCTGGTACTACCAGAAGCAGG GCCAGGCCCCCAGCTGATGGGCAGCTTCGCCAG CACCAGGGAGAGCAGCCTGAAGAGCAGGATCAG CATCATCGGCGGCGGCAGCGGCACCGACGGCAGC GACAACGACTTCACCCTGACCGAGTTCTTCTTGCA GCTGGAGGACCTGGCCGACTACTTCTGCCAGCAG CACTTCGACAACCCACCCCTTACCAGGCCAGG GCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
8B5 抗体 ntVH	SEQ ID NO:23	GAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCGGCGACCTG GTGGCCCCCAGCGGCAGCCTGAACCTGAGCTGCG CCGTGAGCGGCTTACGCTGACCAGCAGCGGCGT GAACTGGTACCAGCAGCCCCCGGCCAGGGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTGGGGCGACGGCAGGA CCGACTACAACAGCCCCCTGATACCAAGGACAG

[0061]

		CGGCAGCGGCACCGACTTCAAGAACCAGGTGTTC CTGGACACCAACGTGCACAGCGACGACACCGCCA GGTACTTCTGCGCCAGGGACAGGTGGTACGGCTA CCTGGACTACTTCGGCAGCGGCACCACCGTGACC GTGAGCAGC
8B5 抗体 ntVL	SEQ ID NO:24	AACATCCTGATGCTGCAGAGCCCCGCCAGCCTGG CCGTGACCGCCGGCGAGAAGGTGACCATGACCTG CAAGAGCAGCCAGAGCCTGGTGAGCACCAGCAGC TACCAGCAGAACTTCATCCACTGGGTGAGGCAGA AGCCCGGCAAGAGCCCCAAGCTGATCATCTACTA CGCCAGCAGCGTGGAGAGCGGGCGTGAAGAGCAG GCTGAGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCAACCCTG AACATCCACACCCTGAACGCCGAGAAGATGACCA GCGACACCGCCACCTACTACTGCCAGCACAGCAA CCAGCTGGGCCTGTACACCTGGGGCCAGGGCACC AAGCTGGAGATCAAG
重组犬瘟热病毒 N 蛋白	SEQ ID NO:25	MASLLKSLTLFKRTRDQPPLASGSGGAIRGIKHVIIV LIPGDSSIVTRSRLDRLVRLVGDPEINGPKLTGILISI LSLFVESPGQLIQRIIDDPDISIKLVEVIPSINSVCGLTF ASRGASLDSEADEFFKIVDEGSKAQGQLGWLENKDI VDIEVDDAEQFNILLASILAQIWILLAKAVTAPDTAA DSEMRRWIKYTQORRVVGEFRMNKIWLDIRNRRIA EDLSLRRFMVALILDIKRSPGNKPRIAEMICDIDNYIV EAGLASFILTIKFGIETMYPALGLHEFSGELTTIESLM MLYQQMGETAPYMVILENSVQNKFSAGSYPLLWSY AMGVGVELENSMGGLNFGRSYFDPAYFRLGQEMV RRSAGKVSSALAAELGITKEEAQLVSEIASKTTEDRT IRAAGPKQSQITFLHSERSEVTNQQPPTINKRSENQG GDKYPIHFSDERFPGYTPDVNSSEWSESRYDTQTIQD DGNDDDRKSMEAIKMRMLTKMLSQPGTSEESSPV YNDRELLN

[0062] 下面详细描述本发明的制备例和实施例,所述制备例和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。制备例和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。

[0063] 其中,制备例及实施例中所涉及的试剂以及来源如下所示:

[0064] 弗氏完全佐剂(sigma公司,货号为F5881);

[0065] 弗氏不完全佐剂(sigma公司,货号为F5506);

[0066] 骨髓瘤细胞(ATCC,货号为BNCC100908);

[0067] 1640培养基(VivaCell,货号为C3010-0500);

[0068] 50%PEG1500(罗氏,货号为10783641001);

[0069] 胎牛血清FBS(四季青,货号为11011-8611);

[0070] 青霉素-链霉素双抗(100×,上海生工,货号为E607011-0100);

[0071] HAT培养基添加剂(50×,sigma公司,货号为H0262);

[0072] HRP标记羊抗鼠二抗(厦门泰京,货号为TJ-211229CN);

[0073] HT培养基添加剂(sigma公司,货号为H0137);

- [0074] 腹水专用佐剂(北京博奥龙,货号为KX0210048);
- [0075] Protein A柱(博格隆生物,货号为AA301307);
- [0076] 辣根过氧化物酶(瑞思试剂,货号为RS20220118);
- [0077] DNP抗体(Merck公司,货号为D9781-2ML);
- [0078] 0.01%胶体金溶液(麦克林,货号为C805628);
- [0079] Anti-Canine Distemper Virus I(海肽生物科技(上海)有限公司,货号为3CD10-5-4);
- [0080] Anti-Canine Distemper Virus II(海肽生物科技(上海)有限公司,货号为3CD10-8-1)。
- [0081] 制备例1.
- [0082] 本制备例提供杂交瘤细胞的制备方法,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,具体步骤如下所示:
- [0083] 1、动物免疫
- [0084] (1)免疫原的制备:
- [0085] 将氨基酸序列如SEQ ID NO:25的重组犬瘟热病毒N蛋白与弗氏完全佐剂等体积混合,得到第一免疫原;
- [0086] 将氨基酸序列如SEQ ID NO:25的重组犬瘟热病毒N蛋白与弗氏不完全佐剂等体积混合,制得第二免疫原;
- [0087] 将氨基酸序列如SEQ ID NO:25的重组犬瘟热病毒N蛋白与生理盐水等体积混合,制得第三免疫原。
- [0088] (2)免疫过程:
- [0089] 第一次免疫:在BALB/C雌鼠背部皮下分3~4点注射50 $\mu$ g第一免疫原;
- [0090] 两周后进行第二次免疫,在BALB/C雌鼠背部皮下分~4点注射50 $\mu$ g第二免疫原;
- [0091] 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 $\mu$ g第二免疫原;
- [0092] 两周后进行第四次免疫-冲击免疫,在BALB/C雌鼠腹腔注射50 $\mu$ g第三免疫原;
- [0093] 24h后进行第五次免疫,在BALB/C雌鼠尾静脉注射50 $\mu$ g第三免疫原。
- [0094] 2、细胞免疫
- [0095] (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;
- [0096] 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;
- [0097] 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 $1 \times 10^4$ /孔),制得饲养层细胞;
- [0098] (2)细胞融合过程:
- [0099] 采用PEG(聚乙二醇)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;
- [0100] 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%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养;

[0101] 其中,配制500ml HAT培养基需要以下试剂:100mL胎牛血清FBS、5mL细胞培养用青霉素-链霉素双抗、10mL的HAT培养基添加剂以及385mL的1640培养基。

[0102] 3、阳性杂交瘤细胞的筛选

[0103] 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,采用常规间接ELISA方法筛选阳性孔。

[0104] 间接ELISA方法具体包括以下步骤:

[0105] (1) 包板:利用氨基酸序列如SEQ ID NO:25的重组犬瘟热病毒N蛋白作为包被抗原,用pH值为9.6的0.05mol/L CB缓冲液(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 31.8g,NaHCO<sub>3</sub>58.8g,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。

[0106] (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/LPBST缓冲液洗涤并拍干,加入100μL/孔的HRP标记羊抗鼠二抗,放置于37℃下孵育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。

[0107] 同时,以细胞免疫步骤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。

[0108] 4、阳性杂交瘤细胞的克隆化

[0109] 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。

[0110] 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%CO<sub>2</sub>湿润培养7~10天,出现肉眼可见的克隆细胞,即可检测抗体。

[0111] 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。

[0112] 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株杂交瘤细胞株进行命名,具体如下表2所示。

[0113] 表2. 10株单抗杂交瘤细胞株及抗体

[0114]

细胞株	单克隆抗体	HRP-抗体偶联复合蛋白
3A7细胞株	3A7抗体	HRP-3A7抗体
5G11细胞株	5G11抗体	HRP-5G11抗体
8G8细胞株	8G8抗体	HRP-8G8抗体

8B5细胞株	8B5抗体	HRP-8B5抗体
2H6细胞株	2H6抗体	HRP-2H6抗体
6E9细胞株	6E9抗体	HRP-6E9抗体
12F11细胞株	12F11抗体	HRP-12F11抗体
6A2细胞株	6A2抗体	HRP-6A2抗体
9C12细胞株	9C12抗体	HRP-9C12抗体
3C3细胞株	3C3抗体	HRP-3C3抗体

[0115] 制备例2.

[0116] 本制备例提供了一种制备抗犬瘟热病毒N蛋白的单克隆抗体的方法,在该方法中,分别以制备例1中制备得到的单抗杂交瘤细胞株进行腹水的制备、单克隆抗体的纯化,具体包括以下步骤:

[0117] S1、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将单抗杂交瘤细胞株( $1 \times 10^6$ 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。

[0118] S2、单克隆抗体的纯化:(1)将S1中收集得到的Balb/c小鼠腹水倒入离心管中,于12500rpm下离心20min,收集上清并依次用0.22 $\mu$ m滤膜过滤、Protein A柱亲和层析纯化,通过各单抗杂交瘤细胞株制备得到的单克隆抗体命名如表2所示。

[0119] 制备例3.

[0120] 本制备例中提供了制备HRP-抗体偶联复合物蛋白的方法,对制备例2中制备得到的10株单克隆抗体进行HRP标记,具体包括以下的步骤:

[0121] S1、将制备例2中制备得到的单克隆抗体采用pH=9.6的0.05mol/L CB缓冲液稀释至2mg/mL后,于4 $^{\circ}$ C下搅拌透析,每隔1h换液一次,共透析5次。

[0122] S2、将浓度为20mg/mL的辣根过氧化物酶(HRP)溶液和浓度为20mg/mL NaIO<sub>4</sub>溶液按体积比1:1混合后,立即用锡纸包裹离心管,避光、4 $^{\circ}$ C下活化HRP 30min;

[0123] 接着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 $\mu$ L乙二醇),继续4 $^{\circ}$ C避光30min,终止活化HRP。

[0124] S3、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),于pH值为9.6的0.05mol/L的CB缓冲液中,4 $^{\circ}$ C避光偶联过夜,

[0125] 第二天更换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。

[0126] S4、按照HRP与NaBH<sub>4</sub>的质量比为25:1的加入量,取浓度为20mg/mL的NaBH<sub>4</sub>溶液与抗体-HRP偶联液混合,于4 $^{\circ}$ C下反应2h,每0.5h上下颠倒混匀几下;

[0127] 用50%硫酸铵溶液、于4 $^{\circ}$ C沉淀反应溶液15min,并于10000rpm下离心10min,得到HRP-抗体偶联复合物蛋白,具体如表2所示。

[0128] S5、将HRP-抗体偶联复合物蛋白用保存液吹溶或涡旋溶解沉淀,于-20 $^{\circ}$ C保存;保存液为50%的甘油、10%的小牛血清以及pH7.4的20mM PBS。

[0129] 最终所得HRP-抗体偶联复合物蛋白命名如表2所示。

[0130] 测试例1.

[0131] 将制备例2制备得到的10株单克隆抗体和制备例3制备得到的10株HRP-抗体偶联

复合蛋白进行两两配对,以单克隆抗体作为捕获抗体、HRP-抗体偶联复合蛋白作为标记抗体,采用双抗夹心法,具体为:将制备例2制备得到的10株单克隆抗体作为捕获抗体,分别包被在酶标板上,往酶标板的孔中加入犬瘟热病毒N蛋白,孵育后洗去未结合的犬瘟热病毒N蛋白;再分别加入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,采用分光光度计在280nm下测定吸光值,结果如表3所示。

[0132] 表3. 10株单克隆抗体和10株HRP-抗体偶联复合蛋白两两配对的检测结果

捕获	检测结果									
抗体	标记抗体 (HRP-抗体类型)									
	3A7	5G11	8G8	8B5	2H6	6E9	12F11	6A2	9C12	3C3
3A7	0.1190	0.0883	0.0976	0.1631	0.1059	0.1059	0.0863	0.1761	0.0734	0.2661
5G11	0.1070	0.0854	0.0915	0.7813	0.0982	0.0791	1.2007	0.0768	0.0772	0.0669
8G8	0.0953	0.0851	0.0826	0.0995	0.0909	0.0871	0.0692	0.0806	0.0847	0.0665
8B5	0.1008	0.5888	0.0922	0.0923	0.7878	0.0699	2.0569	0.0777	0.0866	0.4641
2H6	0.0974	0.0868	0.0897	0.0985	0.0942	0.0852	0.0753	0.0823	0.2791	0.0698
6E9	0.0892	0.0826	0.0808	0.0898	0.0870	0.0677	0.0746	0.0818	0.0793	0.0691
12F11	0.0896	1.2947	0.0858	2.5246	0.0980	1.0877	0.0652	0.4687	0.0680	0.1704
6A2	0.0886	0.0810	0.0770	0.0656	0.0853	0.0566	0.0780	0.0684	0.0707	0.1710
9C12	0.0830	0.0880	0.0943	0.0870	0.1043	0.8940	1.1073	0.0771	0.0763	0.0777
3C3	0.0803	0.0773	0.0938	0.0885	0.0901	0.0960	0.1102	0.0734	1.0737	0.2814

[0135] 由测试结果可知,12F11和8B5这一对单克隆抗体对具有高效价,可应用于犬瘟热病毒及其N蛋白或N蛋白的RDB的定性和/或定量检测中。

[0136] 实施例1.

[0137] 本实施例中提供了12F11细胞株和8B5细胞株的细胞测序结果,具体如表4所示。

[0138] 表4.

12F11 细胞株	12F11 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
8B5 细胞株	8B5 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

[0140] 实施例2.

[0141] 本实施例提供了一种试剂盒,包括利用实施例1中的12F11抗体和8B5抗体制备的胶体金层析纸条,胶体金层析纸条中以12F11抗体作为捕获抗体、8B5抗体作为标记抗体,具

体的制备包括以下步骤:

[0142] 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 $\text{NaCl}$ 、25g的蔗糖,溶于1000mL超纯水中,配制得到包被缓冲液;取1mg/mL的12F11抗体,按1.0 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 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1.0 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 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 $\pm$ 2h。

[0143] S2、金标结合物的标记:称取0.36g的Tris、1.0g的BSA、0.2g的PEG20000、100 $\mu\text{L}$ 的吐温-20、2g的蔗糖、100 $\mu\text{L}$ 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 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 溶液搅拌均匀,接着加入500 $\mu\text{g}$ ~1000 $\mu\text{g}$ 的8B5抗体,搅拌反应15min,加入500 $\mu\text{L}$ 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。

[0144] S3、结合垫的制备:称取0.362g的Tris、0.3g的酪蛋白钠、200 $\mu\text{L}$ 的Triton X-405、100 $\mu\text{L}$ 的吐温-20、3g的蔗糖、100 $\mu\text{L}$ 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5~15wt%,按照35mL/张的涂布量将上述溶液均匀涂布于玻璃纤维膜(25cm $\times$ 30cm)上,置于50℃的烘箱中干燥24h,得到结合垫。

[0145] 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 $\text{NaCl}$ 、25g的蔗糖、0.5g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 $\pm$ 2h,得到样品垫;

[0146] S5、金标纸条的组装:按照图1所示的结构,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。

[0147] 实施例3.

[0148] 本实施例提供了一种试剂盒,按照实施例2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8B5抗体作为捕获抗体、12F11抗体作为标记抗体,其他条件相同。

[0149] 对比例1.

[0150] 本对比例提供了一种试剂盒,按照实施例2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Anti-Canine Distemper Virus I作为捕获抗体、Anti-Canine Distemper Virus II作为标记抗体,其他条件相同。

[0151] 测试例2.

[0152] 对实施例2和3以及对比例1提供的胶体金层析纸条进行敏感性和特异性的评估。

[0153] (1) 敏感性检测:使用稀释液对不同浓度的灭活犬瘟热病毒进行检测(稀释液成分:0.85% $\text{NaCl}$ ),计算敏感性,测试结果如图2~4所示,并根据图2~4整理测试结果得到表

5。

[0154] 表5. 敏感性检测结果

[0155]

稀释倍数	实施例2	实施例3	对比例1
10倍	强阳	强阳	中阳
100倍	强阳	中阳	弱阳
1000倍	中阳	弱阳	弱阳
2000倍	弱阳	弱阳	弱阳
5000倍	弱阳	弱阳	阴性
10000倍	弱阳	阴性	阴性
稀释液	阴性	阴性	阴性

[0156] 由图2~4和表5可知,相较于对比例1中提供的单克隆抗体对而言,实施例2和3中所使用的单克隆抗体对对于犬瘟热病毒N蛋白具有更高的检测灵敏度,且当12F11抗体为捕获抗体以及8B5抗体为标记抗体,该单克隆抗体对具有更高的检测灵敏度。

[0157] (2) 特异性检测:对灭活犬瘟热病毒液、重组N蛋白、麻疹病毒液、呼吸道合胞病毒液、新城疫病毒液、小反刍兽疫病毒液、犬副流感病毒液、传染性肝炎病毒液、犬细小病毒液、单纯疱疹病毒液、铜绿假单胞菌液、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5所示。

[0158] 表5. 特异性检测结果

[0159]

检测物质	实施例2	实施例3	对比例1
灭活犬瘟热病毒液	中阳	中阳	中阳
重组N蛋白	中阳	中阳	中阳
麻疹病毒液	阴性	阴性	阴性
呼吸道合胞病毒液	阴性	阴性	弱阳
新城疫病毒液	阴性	阴性	阴性
小反刍兽疫病毒液	阴性	阴性	阴性
犬副流感病毒液	阴性	阴性	阴性
传染性肝炎病毒液	阴性	阴性	阴性
犬细小病毒液	阴性	阴性	阴性
单纯疱疹病毒液	阴性	阴性	弱阳
铜绿假单胞菌液	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

[0160] 由检测结果可知,实施例2和3中所提供的单克隆抗体对对灭活犬瘟热病毒液、重组N蛋白的检测结果显示阳性,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对于呼吸道合胞病毒液和新生牛血清的检测结果显示弱阳性而言,本发明实施

例2和3中所提供的单克隆抗体对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瘟热病毒检测中时,具有更高的检测精度和效率。

[0161] 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。

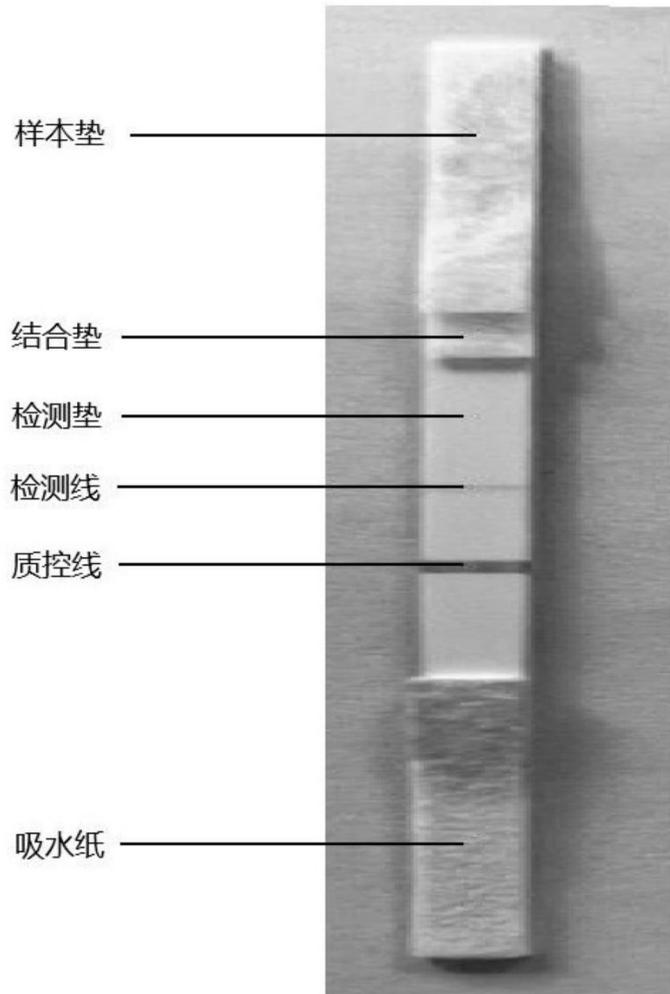


图1

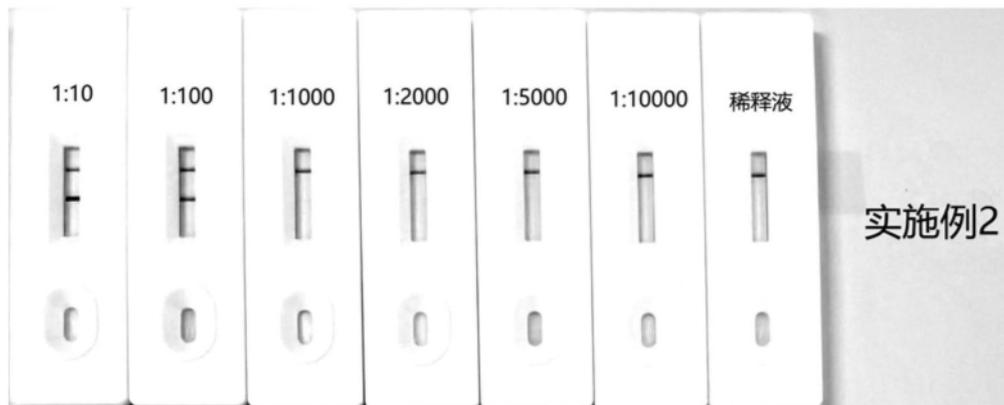


图2

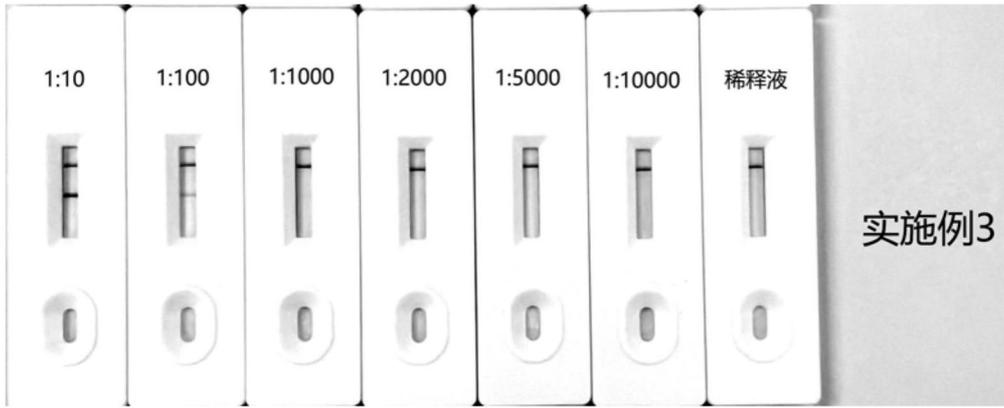


图3

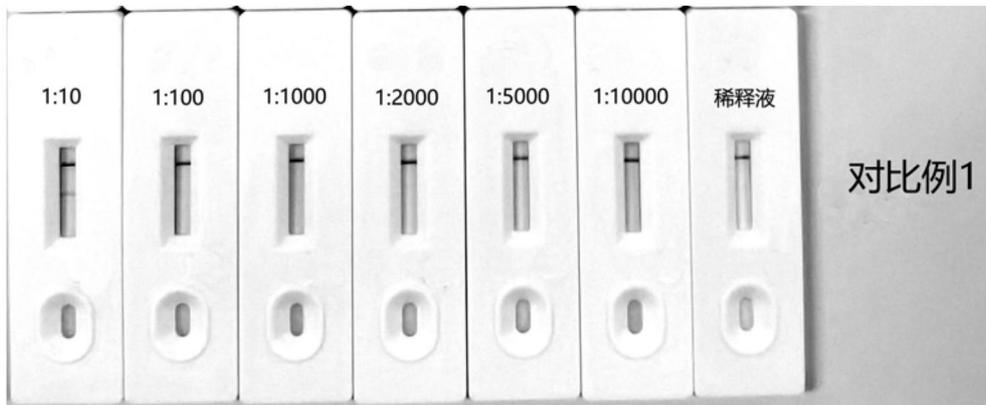


图4