



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116535498 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 04

(21) 申请号 202310347026.2

G01N 33/569 (2006.01)

(22) 申请日 2023.04.03

G01N 33/558 (2006.01)

(71) 申请人 领地动物诊疗科技(厦门)有限公司

G01N 33/543 (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 33/58 (2006.01)

(72) 发明人 张涛 林奕婷 邹柳 周国栋

张松 盛布恩

(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 16/08 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

权利要求书2页 说明书17页

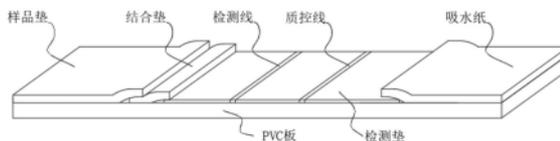
序列表(电子公布) 附图2页

## (54) 发明名称

抗犬细小病毒VP2蛋白抗体及其制备方法和用途

## (57) 摘要

本发明属于免疫学领域和分子病毒学的技术领域,公开了一种抗犬细小病毒VP2蛋白抗体及其制备方法和用途。一种抗犬细小病毒VP2蛋白抗体及或抗原结合片段包括:重链可变区CDR1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:1~3所示、轻链可变区CDR1~3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,重链可变区CDR1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:7~9所示、轻链可变区CDR1~3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。本发明提供的抗体或其抗原结合片段中,第一抗体、第二抗体与犬细小病毒VP2蛋白均具有强结合能力,两种抗体配合使用能够不受其他病毒及药物的干扰,特异性识别犬细小病毒的主流变异株,使用其作为犬细小病毒的检测物质,可实现对于犬细小病毒高准确度且高效的检测。



1. 一种抗犬细小病毒VP2蛋白抗体及或抗原结合片段,其特征在于:包括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;

所述第一抗体或其抗原结合片段中,重链可变区CDR1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:1~3所示或者是与SEQ ID NO:1~3所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链可变区CDR1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:4~6所示或者是与SEQ ID NO:4~6所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列;

所述第二抗体或其抗原结合片段中,重链可变区CDR1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:7~9所示或者是与SEQ ID NO:7~9所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链可变区CDR1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:10~12所示或者是与SEQ ID NO:10~12所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列。

2. 根据权利要求1所述的抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段,其特征在于:所述第一抗体或其抗原结合片段中,重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90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,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90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列;

任选的,所述第二抗体或其抗原结合片段中,重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90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,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90%同源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所述的抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段,其特征在于:所述第一抗体或其抗原结合片段中,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%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链恒定区的重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%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列;

任选的,所述第二抗体或其抗原结合片段中,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%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链恒定区的重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%同源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所述的抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段,其特征在于:所述第一抗体或其抗原结合片段选自Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>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;

任选的,所述第二抗体或其抗原结合片段选自Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>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。

5. 一种核酸分子,其特征在于:所述核酸分子编码权利要求1~4任一所述的抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段。

6. 根据权利要求5所述的核酸分子,其特征在于:所述核酸分子包括核苷酸序列如SEQ ID NO:21~24所示的片段,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片段。

7. 一种细胞,其特征在于:所述细胞分泌权利要求1~4任一所述的抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段。

8. 一种制备权利要求1~4任一所述的抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段的方法,其特征在于:将权利要求6所述的细胞在适合所述抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段表达的培养条件下进行表达。

9. 一种试剂盒,其特征在于:包括权利要求1~4任一所述的抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段、权利要求5或6所述的核酸分子和/或权利要求7所述的细胞。

10. 权利要求1~4任一所述的抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段和/或权利要求9所述的试剂盒在犬细小病毒非诊断目的检测中的应用。

## 抗犬细小病毒VP2蛋白抗体及其制备方法和用途

### 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,尤其涉及一种抗犬细小病毒VP2蛋白抗体及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 犬细小病毒病,又称为犬传染性出血性肠炎,是由犬细小病毒(CPV)感染引起的急性传染病,犬只感染CPV后会出现出血性肠炎、心肌炎、白细胞减少以及脱水等症状,尤其是幼犬的肠胃道感染症状尤为严重。CPV病毒的传染性强、病死率高,对犬只的健康造成了严重影响,给宠物饲养行业造成了巨大的经济损失。

[0003] CPV属于细小病毒科细小病毒属,是一种单股负链DNA病毒,在电镜下呈圆形或六边形,无囊膜包被,结构紧凑,对于外界物理环境的刺激具有很强的抵抗能力。CPV基因组全长约为5200bp,包括两个开放阅读框(ORF),第一个ORF编码NS1和NS2两种非结构蛋白、第二个ORF编码VP1和VP2两种结构蛋白。其中,VP2蛋白是犬细小病毒衣壳中最丰富的结构蛋白,也是犬细小病毒最主要的抗原决定簇,决定了病毒的组织嗜性和宿主范围,能够诱导机体产生中和抗体。

[0004] 目前,临床上最常使用胶体金试纸法对CPV进行检测,该方法仅需将采集的样品稀释后滴加至试纸上等待结构即可,具有操作简便和结果显现快的优点。但是,受到所使用的抗CPV抗体的特异性和灵敏度影响,市面上的CPV胶体金试纸出现假阳性的概率、CPV潜伏初期无法检出阳性的概率以及对CPV变异株无法检出阳性的概率高,具有较大的局限性。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是为了实现对犬细小病毒的高灵敏度和高特异性的快速检测,提供了一种抗犬细小病毒VP2蛋白抗体及其制备方法和用途。

[0006] 第一方面,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采用以下的技术方案:一种抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段,其特征在于:包括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;

[0007] 所述第一抗体或其抗原结合片段中,重链可变区CDR1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:1~3所示或者是与SEQ ID NO:1~3所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链可变区CDR1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:4~6所示或者是与SEQ ID NO:4~6所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列;

[0008] 所述第二抗体或其抗原结合片段中,重链可变区CDR1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:7~9所示或者是与SEQ ID NO:7~9所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链可变区CDR1~3的氨基酸序列如SEQ ID NO:10~12所示或者是与SEQ ID NO:10~12所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列。

[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中,重链可变区氨基

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90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,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90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列。

[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中,重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90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,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90%同源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,所述第一抗体或其抗原结合片段中,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%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链恒定区的重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%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列。

[0012] 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中,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%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,轻链恒定区的重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%同源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,所述第一抗体或其抗原结合片段选自Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>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。

[0014] 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片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>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。

[0015] 第二方面,本发明提供的核酸分子采用以下的技术方案:

[0016] 一种核酸分子,所述核酸分子编码上述的抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段。

[0017] 在一些具体的实施方式中,所述核酸分子包括核苷酸序列如SEQ ID NO:21~24所示的片段,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片段。

[0018] 第三方面,本发明提供的细胞采用以下的技术方案:一种细胞,所述细胞分泌上述的抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段。

[0019] 第四方面,本发明提供的制备上述抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段的方法采用以下的技术方案:一种制备抗犬细小病毒VP2蛋白抗体及或抗原结合片段的方法,将上述细胞在适合所述抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段表达的培养条件下进行表达。

[0020] 第五方面,本发明提供的试剂盒采用以下的技术方案:一种试剂盒,包括上述抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段、上述核酸分子和/或上述细胞。

[0021] 第六方面,本发明提供了上述抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段和/或上述试剂盒在犬细小病毒非诊断目的检测中的应用。

[0022] 有益效果:

[0023] 本发明提供的第一抗体、第二抗体均与犬细小病毒VP2蛋白具有高亲合力;同时,与其他犬细小病毒VP2蛋白抗体相比,本发明提供的抗体对于犬细小病毒中的CPV-2a型、CPV-2b型、New CPV-2a型、New CPV-2b型、CPV-2c型、CPV-DNL型以及Cpv-j1-21-L1型等主流变异株具有良好的识别能力,不受其他病毒及药物的干扰,能够定性、定量地对待测样品中犬细小病毒或VP2蛋白进行检测,提高了犬细小病毒检测的精度和效率。

#### 附图说明

[0024] 图1为本发明中实施例3提供的胶体金试纸的结构示意图;

[0025] 图2为本发明中实施例5提供的检测灵敏度实验中实施例3提供的胶体金试纸的检测结果图;

[0026] 图3为本发明中实施例5提供的检测灵敏度实验中实施例4提供的胶体金试纸的检测结果图;

[0027] 图4为本发明中实施例5提供的检测灵敏度实验中对照组提供的胶体金试纸的检测结果图。

#### 具体实施方式

[0028] 本发明以犬细小病毒VP2蛋白作为早期诊断犬细小病毒感染的标记物,提供了一种抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段,具体包括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。

[0029] 本发明中,第一抗体或其抗原结合片段中决定与犬细小病毒VP2蛋白结合能力大小的片段为重链可变区CDR1~3和轻链可变区CDR1~3。其中,重链可变区CDR1~3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1~3所示或者是SEQ ID NO:1~3所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列与SEQ ID NO:1~3所示序列的同源性可以是90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值;轻链可变区CDR1~3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4~6所示或者是SEQ ID NO:4~6所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列与SEQ ID NO:4~6所示序列的同源性可以是90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值。

[0030] 具体的,第一抗体或其抗原结合片段中,重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:13或者是与SEQ ID NO:13所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列与SEQ ID NO:13所示序列的同源性可以是90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值;轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:14或者是与SEQ ID NO:14所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列与SEQ ID NO:14所示序列的同源性可以是90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值。

[0031] 具体的,第一抗体或其抗原结合片段中,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所述序列具有至少70%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列与SEQ ID NO:17所示序列的同源性可以是70%、75%、78%、80%、84%、88%、90%、95%、100%或它们中间的任意值;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所述序列具有至少70%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列与SEQ ID NO:13所示序列的同源性可以是70%、75%、78%、80%、84%、88%、90%、95%、100%或它们中间的任意值。

[0032] 本发明中,第二抗体或其抗原结合片段中决定与犬细小病毒VP2蛋白结合能力大小的片段为重链可变区CDR1~3和轻链可变区CDR1~3。其中,重链可变区CDR1~3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:7~9所示或者是SEQ ID NO:7~9所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列与SEQ ID NO:7~9所示序列的同源性可以是90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值;轻链可变区CDR1~3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:10~12所示或者是SEQ ID NO:10~12所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列与SEQ ID NO:10~12所示序列的同源性可以是90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值。

[0033] 具体的,第二抗体或其抗原结合片段中,重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:15或者是与SEQ ID NO:15所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列与SEQ ID NO:15所示序列的同源性可以是90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值;轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:16或者是与SEQ ID NO:16所示序列具有至少90%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列与SEQ ID NO:16所示序列的同源性可以是90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值。

[0034] 具体的,第二抗体或其抗原结合片段中,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所述序列具有至少70%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列与SEQ ID NO:19所示序列的同源性可以是90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值;轻链恒定区的重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所述序列具有至少70%同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列,变体序列与SEQ ID NO:19所示序列的同源性可以是90%、93%、94%、95%、97%、90%、99%、100%或它们中间的任意值。

[0035] 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')<sub>2</sub>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。

[0036] 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')<sub>2</sub>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。

[0037] 本发明中,Fv片段是指包含完整的抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段,Fv片段包含由一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域以紧密的非共价结合的方式形成的二聚体,且重链可变区结构域和轻链可变区结构域折叠产生6个超变环,超变环上的氨基酸残赋予了抗原抗体结合特异性。

[0038] 本发明中,ScFv片段是指包含连接呈单个多肽链的重链可变区结构域和轻链可变区结构域的抗体片段。

[0039] 本发明中,dAb片段为结构域抗体,是抗体中最小已知的抗原结合片段,可通过培

养微生物细胞制备,其具有良好的生物活性和稳定性。

[0040] 本发明中,双抗体是指构建在重链可变区结构域和轻链可变区结构域之间具有短链接臂的ScFv片段制备的小抗体片段,使得获得的V结构域的链间配对,形成具有两个犬细小病毒VP2蛋白结合位点的片段。

[0041] 本发明中,人源化抗体指的是具有从非人来源引入其中一个或多个氨基酸残基的人抗体,通过非人氨基酸残基的引入以提高或改善与犬细小病毒VP2蛋白的结合能力。

[0042] 本发明中,嵌合抗体指的是分子中部分重链和/或轻链与来自特定物种的或属于特定抗体类别或亚类别的抗体的相应序列是相同或同源的,而链的其余部分与来自另一个物种或属于另一个抗体类别或亚类的抗体以及此类抗体的片段的相应序列是相同的或是同源的,能表现出与犬细小病毒VP2蛋白良好的的结合能力。

[0043] 本发明还提供了一种核酸分子,该核酸分子编码上述的抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段。

[0044] 在一些具体的实施方式中,上述核酸分子包括编码第一抗体重链可变区的核苷酸片段,该核苷酸片段的序列如SEQ ID NO:21所示,或者是与SEQ ID NO:21所述核苷酸序列具有至少90%同源性且仍编码具有本发明的抗体或其抗原结合部分活性的变体分子,亦或者是与序列如SEQ ID NO:21所示的核酸分子完全互补或在中度至高度严格条件下杂交的核酸分子;还包括编码第一抗体轻链可变区的核苷酸序列,该核苷酸片段的序列如SEQ ID NO:22所示,或者是与SEQ ID NO:22所述核苷酸序列具有至少90%同源性且仍编码具有本发明的抗体或其抗原结合部分活性的变体分子,亦或者是与序列如SEQ ID NO:22所示的核酸分子完全互补或在中度至高度严格条件下杂交的核酸分子。

[0045] 在一些具体的实施方式中,上述核酸分子包括编码第二抗体重链可变区的核苷酸片段,该核苷酸片段的序列如SEQ ID NO:23所示,或者是与SEQ ID NO:23所述核苷酸序列具有至少90%同源性且仍编码具有本发明的抗体或其抗原结合部分活性的变体分子,亦或者是与序列如SEQ ID NO:23所示的核酸分子完全互补或在中度至高度严格条件下杂交的核酸分子;还包括编码第二抗体轻链可变区的核苷酸片段,该核苷酸片段的序列如SEQ ID NO:24所示,或者是与SEQ ID NO:24所述核苷酸序列具有至少90%同源性且仍编码具有本发明的抗体或其抗原结合部分活性的变体分子,亦或者是与序列如SEQ ID NO:24所示的核酸分子完全互补或在中度至高度严格条件下杂交的核酸分子。

[0046] 本发明中,该核酸分子位于真核细胞的核基因组中,或是位于表达载体存在于真核细胞或原核细胞的细胞质中;其中,具体的表达载体可以是真核表达载体或原核表达载体,更加具体的可以是但不限于p-CMV-NEO-BAN载体、pEGFP增强型绿色荧光蛋白表达载体、pSV2表达载体、p-CMV-163表达载体和CMV4表达载体中的一种或多种。

[0047] 本发明中提供的细胞可分泌上述的抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段。

[0048] 在一些具体的实施方式中,该细胞中包含上述核酸分子或包含有上述核酸分子的表达载体,具体的可以是但不限于CHO细胞、BHK细胞、SP2/0细胞、COS细胞和BHK细胞中的一种或多种。

[0049] 本发明中提供的制备上述抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段的方法,具体为,将上述细胞在合适的培养条件下进行培养,收集细胞表达产物并经分离纯化,得到

抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段。

[0050] 本发明提供的试剂盒中,包含上述得抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段、核酸分子和/或细胞。

[0051] 本发明还提供了上述抗犬细小病毒VP2蛋白或其抗原结合片段盒/或上述试剂盒在犬细小病毒非诊断目的检测中的应用。

[0052] 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。

[0053] 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:

[0054] 弗氏完全佐剂(sigma公司,货号为F5881);

[0055] 弗氏不完全佐剂(sigma公司,货号为F5506);

[0056] 骨髓瘤细胞(ATCC,货号BNCC100908);

[0057] 1640培养基(VivaCell,货号C3010-0500);

[0058] PEG1500(罗氏,货号为10783641001);

[0059] 胎牛血清FBS(四季青,货号为11011-8611);

[0060] 青霉素-链霉素双抗(100×,上海生工,货号为E607011-0100);

[0061] HAT培养基添加剂(50×,sigma公司,货号为H0262);

[0062] HRP标记羊抗鼠二抗(厦门泰京,货号为TJ-211229CN);

[0063] HT培养基添加剂(VivaCell,货号C3010-0500);

[0064] 腹水专用佐剂(北京博奥龙,货号KX0210048);

[0065] Protein A柱(博格隆生物,货号为AA301307);

[0066] HRP(瑞思试剂,货号为RS20220118);

[0067] 羊抗鼠IgG多克隆抗体(杭州隆基生物技术有限公司);

[0068] BSA(Sigma,货号为V900933);

[0069] 胶体金溶液(麦克林,货号为C805628);

[0070] 犬细小病毒单抗7D5(珠海博美生物科技有限公司,货号为M0471-1112);

[0071] 犬细小病毒单抗4C11(珠海博美生物科技有限公司,货号为M0474-0060)。

[0072] 实施例1.

[0073] 本实施例用于说明表达抗犬细小病毒VP2蛋白抗体或其抗原结合片段的细胞的制备、筛选和克隆化,具体包括以下步骤。

[0074] 一、动物免疫

[0075] 免疫对象为8周龄BALB/C雌鼠。

[0076] 免疫所用的抗原为大肠杆菌重组表达的新型犬细小病毒VP2蛋白,其包括如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列。

[0077] 免疫方式具体如下:

[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;

[0080] 将大肠杆菌重组表达的新型冠状病毒N蛋白与弗氏不完全佐剂等体积混合,制得第二免疫原;

[0081] 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。

[0082] (2) 免疫过程:

[0083] 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;

[0084] 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 $\mu$ g第二免疫原;

[0085] 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;

[0086] 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;

[0087] 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。

[0088] 二、细胞免疫

[0089] BALB/C雌鼠第五次免疫后的第三天开始细胞免疫。

[0090] 细胞免疫的过程具体包括以下步骤:

[0091] (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;

[0092] 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;

[0093] 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;

[0094] (2) 细胞融合过程:

[0095] 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;

[0096] 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%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养;

[0097] 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 $\times$ )、10mL的HAT培养基添加剂(50 $\times$ )和385mL的1640培养基。

[0098] 三、阳性杂交瘤细胞的筛选

[0099] 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。

[0100] 间接ELISA方法具体包括以下步骤:

[0101] (1) 包板:利用大肠杆菌重组表达的犬细小病毒VP2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Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、58.8g的NaHCO<sub>3</sub>,并用超纯水补足至2L)稀释至2 $\mu$ g/mL,以100 $\mu$ L/孔加入酶标板,4 $^{\circ}$ 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 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C封闭过夜后拍干备用。

[0102] (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 $\mu$ L/孔加入酶标板,放置37 $^{\circ}$ C孵育60min后,用含Tween-20的0.01mol/L的PBST缓冲液洗涤并拍干,加入100 $\mu$ L/孔的HRP标记羊抗鼠二抗,放置37 $^{\circ}$ C孵育60min后洗涤并拍干,加入100 $\mu$ L/孔的TMB显色液,放置37 $^{\circ}$ C避光显色10min,加入50 $\mu$ L/孔的1mol/L HCl终止反应。

[0103] 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。

[0104] 四、阳性杂交瘤细胞的克隆化

[0105] 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。

[0106] 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 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>湿润培养7~10d,出现肉眼可见的克隆细胞,即可检测抗体。

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] 表1.

细胞株	单克隆抗体	HRP-抗体偶联复合蛋白
8A6细胞株	8A6抗体	HRP-8A6抗体
5F5细胞株	5F5抗体	HRP-5F5抗体
6A6细胞株	6A6抗体	HRP-6A6抗体
9A10细胞株	9A10抗体	HRP-9A10抗体
11G6细胞株	11G6抗体	HRP-11G6抗体
2A9细胞株	2A9抗体	HRP-2A9抗体
2D9细胞株	2D9抗体	HRP-2D9抗体
12D9细胞株	12D9抗体	HRP-12D9抗体
3E11细胞株	3E11抗体	HRP-3E11抗体
8F4细胞株	8F4抗体	HRP-8F4抗体

[0111] 实施例2.

[0112] 本实施例用于说明抗犬细小病毒VP2蛋白抗体的制备、筛选和测序,具体包括以下步骤。

[0113] 一、抗犬细小病毒VP2蛋白抗体的制备

[0114] (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 $\times$ 10<sup>6</sup>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。

[0115] (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 $\mu$ m滤膜过滤、Protein A柱亲和层析纯化。

[0116] 利用Protein A柱亲和层析纯化的具体步骤如下:

[0117] 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;

[0118] 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;

[0119] 上样:将0.22 $\mu$ m滤膜过滤后的样品上样,流速为5mL/min;

[0120] 洗涤:用10个柱体积的预冷的Protein A柱平衡液清洗层析柱;

[0121] 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;

[0122] 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。

[0123] 二、HRP-抗体偶联复合蛋白的制备

[0124] (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℃下搅拌透析,每隔1h换液一次,共透析5次。

[0125] (2) 将HRP溶于超纯水中配成浓度为20mg/mL的HRP溶液,将NaIO<sub>4</sub>溶于超纯水配成浓度为20mg/mL的NaIO<sub>4</sub>溶液;涡旋充分溶解后,将HRP溶液和NaIO<sub>4</sub>溶液按1:1的体积比混合,即NaIO<sub>4</sub>溶液缓慢加入HRP溶液中,立即用锡纸包裹离心管,避光、4℃下活化HRP 30min。

[0126] (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 $\mu$ L乙二醇),继续4℃避光30min,终止HRP活化。

[0127] (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NaIO<sub>4</sub>),于pH=9.6的0.05mol/L的CB缓冲液中,于4℃、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。

[0128] (5) 用纯水配制浓度为20mg/mL的NaBH<sub>4</sub>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 $\mu$ L的NaBH<sub>4</sub>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。

[0129] (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。

[0130] 三、抗犬细小病毒VP2蛋白抗体的筛选

[0131] 将步骤二得到的10株抗体和步骤三得到的10株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。

[0132] 将10株抗体作为捕获抗体分别包被于酶标板上,接着相酶标板的孔中加入重组犬细小病毒VP2蛋白,孵育后洗去未结合的重组犬细小病毒VP2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。

[0133] 表2.

[0134]	捕获 抗体	检测结果									
		标记抗体 (HRP-抗体类型)									
		8A6	5F5	6A6	9A10	11G6	2A9	2D9	12D9	3E11	8F4
[0135]	8A6	0.0884	0.1312	0.1073	0.2036	0.2145	1.2903	0.1630	0.1443	0.2383	0.8595
	5F5	0.1186	0.1950	1.2204	0.6200	0.1953	1.1485	0.2441	0.3405	0.3274	0.2137
	6A6	0.1228	0.1634	0.2011	0.2939	0.3534	0.1305	0.1444	0.1868	0.3752	0.3132
	9A10	0.1313	1.7322	0.2336	0.2000	0.3692	0.3331	0.1743	0.3374	0.3791	1.8115
	11G6	0.1280	0.1450	0.1779	0.2831	0.3468	0.3569	0.3912	0.1584	0.4401	0.1594
	2A9	0.9067	0.1012	0.1073	0.1799	0.2281	0.1542	0.2257	0.1251	0.1132	0.6174
	2D9	0.2242	0.2727	0.1363	0.0832	0.3533	0.3808	0.3681	0.3065	0.2862	0.7974
	12D9	0.1942	0.1052	0.2162	0.1926	0.2091	0.2518	0.1728	0.1605	0.1118	1.5965
	3E11	0.1586	0.3441	0.2880	0.2352	0.2706	0.3197	0.2555	0.1314	0.1285	0.9540
	8F4	0.2234	0.2020	0.2580	1.0922	0.1747	0.5463	0.8313	2.0969	0.9261	0.2226

[0136] 由测试结果可知,8F4抗体和12D9抗体这一对抗体效价高,应用于犬细小病毒或其VP2蛋白的检测中。

[0137] 四、8F4细胞和12D9细胞的细胞测序

[0138] 分别扩大培养8F4细胞和12D9细胞,并收集 $5 \times 10^6$ 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。

[0139] 表3.

[0140]	8F4 细胞	8F4 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	
12D9 细胞	12D9 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	

[0141] 实施例3.

[0142] 本实施例用于说明用于犬细小病毒非诊断目的检测的胶体金试纸的制备,具体包括以下步骤。

[0143] 一、检测垫的制备

[0144] (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。

[0145] (2) 检测线制备:取1mg/mL的12D9抗体,在硝酸纤维膜上制备检测线,喷涂量为1.2 μL/cm,喷涂长度为30cm。

[0146] (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1.2 μL/cm,喷涂长度为30cm,且质控线和检测线的距离为5mm。

[0147] (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±2h。

[0148] 二、金标结合物的制备

[0149] (1) 相关溶液的配制:

[0150] 0.2M的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液的配制:称取2.7642g的无水碳酸钾溶于100mL的纯水中。

[0151] 20%的BSA溶液的配制:称取20g的BSA和100μL的proclin300溶于100mL超纯水中,置于4℃下保存备用。

[0152] 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。

[0153] (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500~2000μL的0.2M的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液搅拌均匀;再加入500~1500μg的8F4抗体,搅拌反应10-20min;接着加入500μL的20% BSA溶液进行搅拌,封闭5-10min,于7000-9000r/min离心20min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。

[0154] 三、结合垫的制备

[0155] (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。

[0156] (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±2h。

[0157] 四、样品垫的制备

[0158] (1) 样本垫处理液的配制:0.242g的Tris、0.85g的NaCl、0.5g的酪蛋白钠、2g的蔗糖和100μL的proclin300溶于100mL超纯水中,调节pH至8.0,置于4℃下保存备用。

[0159] (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。

[0160] 五、胶体金试纸的组装

[0161] 按照图1所示的胶体金试纸的结构,依次将样品垫、结合垫粘贴在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。

[0162] 实施例4.

[0163] 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8F4抗体作为捕获抗体,以12D9抗体作为标记抗体,其他的条件相同。

[0164] 实施例5.

[0165] 本实施例用于说明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

检测灵敏度。

[0166] 实验组:实施例3和实施例4中提供的胶体金试纸;

[0167] 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,胶体金试纸中以犬细小病毒单抗7D5作为捕获抗体、以犬细小病毒单抗作为标记抗体其他的条件相同。

[0168] 检测方法:以灭活的原始CPV-2型病毒培养液作为检测对象,利用稀释液(成分:10mM PBS,0.1%吐温20)依次按照1:100、1:500、1:1000、1:2000、1:4000、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2~4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。

[0169] 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
500 倍	中阳性	中阳性	弱阳性
1000 倍	中阳性	弱阳性	弱阳性
2000 倍	中阳性	弱阳性	弱阳性
4000 倍	弱阳性	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

[0171] 由图2~4和表4中的测试结果可知,本发明实施例3和4提供的胶体金试纸在原始CPV-2型病毒培养液稀释至10000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CPV-2型病毒培养液稀释至4000倍时已无法检测犬细小病毒,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8F4抗体和12D9抗体这一对抗体对具有优秀的检测灵敏度。

[0172] 实施例6.

[0173] 本实施例用于说明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检测特异性。

[0174] 实验组:实施例3和实施例4中提供的胶体金试纸;

[0175] 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,胶体金试纸中以犬细小病毒单抗7D5作为捕获抗体、以犬细小病毒单抗作为标记抗体其他的条件相同。

[0176] 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。表5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特异性检测结果。

[0177] 表5.

[0178]

检测对象	实验组		对照组
	实施例 4	实施例 5	
原始 CPV-2 型病毒液	中阳	中阳	中阳
CPV-2a 型病毒液	中阳	中阳	中阳
CPV-2b 型病毒液	中阳	中阳	阴性
New CPV-2a 型病毒液	中阳	中阳	中阳
New CPV-2b 型病毒液	中阳	中阳	中阳
CPV-2c 型病毒液	中阳	中阳	阴性
CPV-DNL 型病毒液	中阳	中阳	中阳
Cpv-ji-21-L1 型病毒液	中阳	中阳	中阳
重组 NS1 蛋白	阴性	阴性	阴性
重组 NS2 蛋白	阴性	阴性	阴性
重组 VP1 蛋白	阴性	阴性	阴性
重组 VP2 蛋白	中阳	中阳	中阳
犬冠状病毒液	阴性	阴性	阴性
犬瘟热病毒液	阴性	阴性	阴性
传染性肝炎病毒液	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

[0179] 由检测结果可知,由检测结果可知,本发明实施例3和4提供的胶体金试纸在对于犬细小病毒的多种变异株以及重组VP2蛋白进行检测时具有明显的条带,且对于其他的物质检测均呈阴性;而对照组中无法检出CPV-2b和CPV-2c这两种毒株,且对新生牛血清进行检测时出现了假阳性的结果。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8F4抗体和12D9抗体这一对抗体对具有优秀的检测特异性。

[0180] 本发明中所涉及到的氨基酸、核苷酸序列如表6所示。

[0181] 表6.

[0182]

名称	编号	序列信息
8F4 抗体 VH CDR1	SEQ ID NO:1	GFQLSTSYVY
8F4 抗体 VH CDR2	SEQ ID NO:2	IWGDGRK
8F4 抗体 VH CDR3	SEQ ID NO:3	AICDNPMYFDY
8F4 抗体 VL CDR1	SEQ ID NO:4	QSVATSSYVY
8F4 抗体 VL CDR2	SEQ ID NO:5	FAS
8F4 抗体 VL CDR3	SEQ ID NO:6	QQHDFPTPFT
12D9 抗体 VH CDR1	SEQ ID NO:7	GSTVTSQYA
12D9 抗体 VH CDR2	SEQ ID NO:8	ITYSGST
12D9 抗体 VH CDR3	SEQ ID NO:9	ATLQAHYDS
12D9 抗体 VL CDR1	SEQ ID NO:10	QSLVMSYTG
12D9 抗体 VL CDR2	SEQ ID NO:11	FAS
12D9 抗体 VL CDR3	SEQ ID NO:12	QHSWLGLRYT
8F4 抗体 VH	SEQ ID NO:13	DVQIQESGPGLVKPSQSLTCTVTGFQLSTS YYVLTWPRQPPCKCLGWLGMWGDGRKDY NSVLKSRLSITRDFTLTISVFLKMNSLQTTDDTA RYYCAICDNPMYFDYWGQGTTLTVSS
8F4 抗体 VL	SEQ ID NO:14	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSVAT SSYYVLAWAQPKPCQSPWLLIYFASTRESGVP DRFTGSTTRDGSDFTLTISNVSNLADYFCQQ HDFPTPFTFGSGTKLEIK
12D9 抗体 VH	SEQ ID NO:15	QVQLKESGPGLVAPSQLNLTCTVSGSTVTS QYAWNWARQFPGNLEWMGSITYSGSTSYH PSLKSRLSIFIGGGSGQLKSQAEDNSVTTDD TATYYCATLQAHYDSGQGASVTVSS
12D9 抗体 VL	SEQ ID NO:16	DIVLTQSPASLAVTAQRATMRCKSSQSLVMS YTGMHAYQAKPGQPPKLLIKFASNLESGVPT SKNQFGTTRDGSDFTLNIHPVEEEDTATYYCQ HSWLGLRYTFGGGKLEIK
8F4 抗体 CH	SEQ ID NO:17	AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKG YFPEPVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT LSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDK KIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE

[0183]

		VHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWL NGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAP QVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDIT VEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYS KLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTE KSLSHSPGK
8F4 抗体 CL	SEQ ID NO:18	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNF YPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRECE
12D9 抗体 CH	SEQ ID NO:19	AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKG YFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT LSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDK KIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE VHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWL NGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAP QVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDIT VEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYS KLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTE KSLSHSPGK
12D9 抗体 CL	SEQ ID NO:20	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNF YPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRECE
8F4 抗体 ntVH	SEQ ID NO:21	AACATCCTGATGACCCAGAGCCCCGCCAGC CTGGCCGTGACCGCCGGCGAGAAGGTGACC ATGACCTGCAAGAGCAGCGGCTTCCAGCTG AGCACCAGCTACTACGTGCTGACCTGGCCC AGGCAGCCCCCTGCAAGTGCCTGGGCTGG CTGGGCATGATCTGGGGCGACGGCAGGAA GGACTACAACAGCGTGCTGAAGAGCAGGCT GAGCATCACCAGGGACTTCACCCTGACCAT CAGCGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCA GACCGACGACACCGCCAGGTACTACTGCGC CATCTGCGACAACCCCATGTACTTCGACTA CTGGGGCCAGGGCACCACCCTGACCGTGAG CAGC
8F4 抗体 ntVL	SEQ ID NO:22	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGGCCATGAGCGTGGGCCAGAAGGTGACC

[0184]

		<p>ATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCC  CACCAGCAGCTACTACGTGCTGGCCTGGGC  CCAGCCCAAGCCCTGCCAGAGCCCCTGGCT  GCTGATCTACTTCGCCAGCACCAGGGAGAG  CGGCGTGCCCGACAGGTTACCCGGCAGCAC  CACCAGGGACGGCAGCGACTTCACCCTGAC  CATCAGCAACGTGAGCAACAGCCTGGCCGA  CTACTTCTGCCAGCAGCACGACTTCCCCAC  CCCCTTACCTTCGGCAGCGGCACCAAGCT  GGAGATCAAG</p>
12D9 抗体 ntVH	SEQ ID NO:23	<p>CAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCCGG  CCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAACCT  GACCTGCACCGTGAGCGGCAGCACCGTGAC  CAGCGACCAGTACGCCTGGAAGTGGGCCAG  GCAGTTCCCCGGCAACCTGCTGGAGTGGAT  GGGCAGCATCACCTACAGCGGCAGCACCAG  CTACCACCCAGCCTGAAGAGCAGGATCAG  CATCAAGTTCATCGGCGGCGGCAGCGGCCA  GCTGAAGAGCCAGCAGGCCGAGGACAACA  GCGTGACCACCGACGACACCGCCACCTACT  ACTGCGCCACCCTGCAGGCCACTACGACA  GCGGCCAGGGCGCCAGCGTGACCGTGAGC  AGC</p>
12D9 抗体 ntVL	SEQ ID NO:24	<p>GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGCCAGC  CTGGCCGTGACCGCCCAGAGGGCCACCATG  AGGTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGGTGAT  GAGCTACACCGGCATGCACGCCTACCAGGC  CAAGCCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGAT  CAAGTTCGCCAGCAACCTGGAGAGCGGCGT  GCCACCAGCAAGAACCAGTTCGGCACCAC  CAGGGACGGCAGCGACTTCACCCTGAACAT  CCACCCCGTGGAGGAGGAGGACACCGCCA  CCTACTACTGCCAGCACAGCTGGCTGGGCC  TGAGGTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGC  TGGAGATCAAG</p>
重组犬细小病毒 VP2 蛋白	SEQ ID NO:25	<p>MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGG  GGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEIT  ANSSRLVHLNMPESENYRRVVVNNMDKTAV  NGNMALDDIHAQIVTPWSLVDANAWGVWF  NPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLT</p>

[0185]

	<p>VSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTM                  PFTPAAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFQW                  DRTLIPSHTGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIE                  NSVPVHLLRTGDEFATGTFDFDCKPCRLTHT                  WQTNRALGLPPFLNSLPQSEGATNFGDIGVQ                  QDKRRGVTQMGNTNYITEATIMRPAEYGYSA                  PYYSFEASTQGPFKTPIAAGRGAQTYENQA                  ADGDPRYAFGRQHGGKTTTTGETPERFTYIA                  HQDTGRYPEGDWIQNINFNLPTNDNVLLPT                  DPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYP                  NGQIWDKEFDLTKPRLHVNAPFVCQNNCPG                  QLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDF                  WWKGKLVFKAKLRASHTWNPIQQMSINVDN                  QFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY</p>
--	--

[0186] 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。

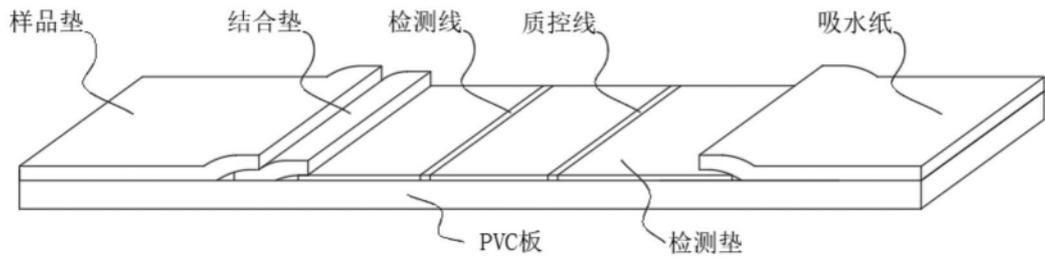


图1



图2



图3



图4