



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118064377 A

(43) 申请公布日 2024.05.24

(21) 申请号 202410187842.6

G01N 33/569 (2006.01)

(22) 申请日 2024.02.20

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:C202408 2024.01.09

(71) 申请人 江苏省农业科学院

地址 210018 江苏省南京市玄武区孝陵卫
钟灵街50号

(72) 发明人 刘茂军 张纹纹 李文良 程子龙
杨蕾蕾

(74) 专利代理机构 江苏圣典律师事务所 32237
专利代理师 肖明芳

(51) Int. Cl.

C12N 5/20 (2006.01)

G07K 16/12 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

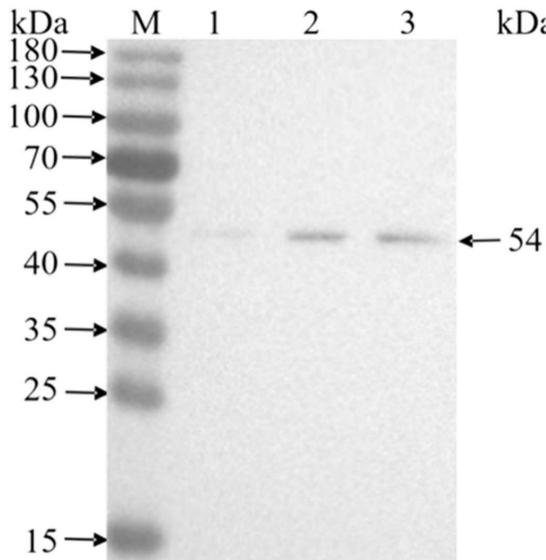
权利要求书1页 说明书13页 附图1页

(54) 发明名称

一种分泌抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体的
杂交瘤细胞株及其单抗与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种分泌抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其单抗与应用,所述的杂交瘤细胞株为杂交瘤细胞株1A11,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:C202408。所述的杂交瘤细胞株1A11分泌的单克隆抗体为单克隆抗体1A11,本发明所提供的单克隆抗体1A11可用于检测绵羊肺炎支原体,特异性强,不与猪鼻支原体、猪肺炎支原体、鸡毒支原体和牛支原体等常见动物支原体发生反应。本发明基于单克隆抗体1A11建立的双抗夹心ELISA方法的批间和批内变异系数均低于10%,特异性、重复性、敏感性良好,与CCU含量呈正相关,是一种快速、简易、准确的病原检测方法,对绵羊肺炎支原体的快速定量和疫苗研究具有重要意义。



1. 一种分泌抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其特征在于,所述的杂交瘤细胞株为杂交瘤细胞株1A11,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCCN0:C202408,保藏时间为2024年1月9日。

2. 一种由如权利要求1所述的杂交瘤细胞株分泌获得的抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体1A11。

3. 一种如权利要求1所述的杂交瘤细胞株、或者如权利要求2所述的单克隆抗体1A11在制备检测绵羊肺炎支原体试剂和/或试剂盒中的应用。

4. 一种用于检测绵羊肺炎支原体的双抗夹心ELISA试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括捕获抗体、检测抗体和酶标二抗;

所述捕获抗体为如权利要求2所述的单克隆抗体1A11;

所述检测抗体为绵羊肺炎支原体高免兔血清;

所述酶标二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述的绵羊肺炎支原体高免兔血清,通过绵羊肺炎支原体免疫兔子获得。

6. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒还包括洗涤液,封闭液,底物液和终止液。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述的洗涤液为PBST;所述的封闭液为酪蛋白、牛血清蛋白、脱脂奶粉或明胶中的任意一种;所述的底物液为TMB显色液;所述的终止液为2M硫酸。

8. 权利要求4-7中任意一项所述的试剂盒在非诊断目的检测绵羊肺炎支原体中的应用。

9. 一种非诊断目的检测绵羊肺炎支原体的双抗夹心ELISA方法,其特征在于,包括如下条件:单克隆抗体1A11稀释倍数为1:2.5~1:320v/v,包被条件为37°C,60min后4°C过夜或者直接4°C过夜;封闭液封闭条件为37°C,1h;待检抗原作用条件为37°C,30~120min;检测抗体稀释倍数为1:256~1:16384v/v,作用条件为37°C,30~120min;酶标二抗的稀释倍数为1:1000~1:8000v/v,作用条件为37°C,30~120min;显色时间为5~20min。

10. 根据权利要求9所述的双抗夹心ELISA方法,其特征在于,所述的待检抗原,为绵羊肺炎支原体培养物原液或者所述原液经超声裂解、硫柳汞灭活或甲醛灭活中任意一种方式处理后的混合物体系。

一种分泌抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其单抗与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物检测领域,具体涉及一种分泌抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其单抗与应用。

背景技术

[0002] 绵羊肺炎支原体 (*Mycoplasma ovipneumoniae*, Mo) 可引起羊支原体肺炎 (*Mycoplasma pneumoniae* of sheep and goat, MPSG), 该病是一种绵羊和山羊慢性呼吸道传染病, 主要以气喘为临床特征, 在世界范围内广泛流行, 山羊和绵羊都较易感, 临床特征是高热、流鼻涕、咳嗽和纤维素胸膜肺炎; 该病具有很强的传染性, 四季均可感染, 尤其在春冬多发, 羔羊最易感, 感染率高达95.3%, 病死率为27.5%。感染此病原体容易诱发其他细菌性肺炎, 特别是巴氏杆菌病和病毒感染, 这会加剧病理过程, 进而导致死亡, 造成重大经济损失。

[0003] 疫苗是防控该病的最经济手段。但由于没有标准的实验动物羊, 疫苗的效力检验较为困难, 影响了疫苗的检验和研发。同时, 目前支原体的含量测定还是采用经典的变色单位 (CCU), 该方法仅可测定活的支原体, 而对活力不足或死亡支原体不能测定, 同时该方法需耗时7-10日且需要进行支原体培养, 因此, CCU作为灭活疫苗生成中抗原定量方法具有多种缺陷。目前, 国际上灭活疫苗抗原定量方法的已有抗原ELISA方法上市应用。但绵羊肺炎支原体抗原ELISA方法未见报道。

[0004] 在羊支原体肺炎诊断中绵羊肺炎支原体病原检测的方法目前报道的有分离培养, PCR和荧光定量PCR, 其中, 病原分离培养需要专业的实验室和实验技术, PCR方法, 需要进行核酸提取等操作, 操作繁杂、成本较高, 且需要较为昂贵的仪器; 而病原ELISA检测方法具有方法简单, 条件要求低, 通量高的特点。因此, 临床需要提供一种病原ELISA检测方法对大量样品进行Mo病原检测。

[0005] 因此, 利用单克隆抗体建立的检测Mo的双抗夹心ELISA检测方法, 达到快速、准确、灵敏的检测Mo, 对于疫苗生产中绵羊支原体的定量和临床样品的Mo检测具有重要意义。

发明内容

[0006] 发明目的: 本发明所要解决的技术问题是针对现有技术的不足, 提供一种分泌抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其单抗和应用。

[0007] 为了解决上述技术问题, 本发明公开了一种分泌抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其单抗和应用。具体技术方案为:

[0008] 第一方面, 本发明提供了一种分泌抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 所述的杂交瘤细胞株为杂交瘤细胞株1A11 (Hybridoma cell line 1A11), 保藏于中国武汉武汉大学, 保藏编号为CCTCC NO:C202408, 保藏时间为2024年1月9日。

[0009] 其中, 如上述第一方面所述的杂交瘤细胞株1A11的制备方法为: 以绵羊肺炎支原

体全菌蛋白作为免疫抗原免疫小鼠,将免疫小鼠的脾脏细胞和小鼠的骨髓瘤细胞融合,再经3次亚细胞克隆筛选得到能稳定分泌抗绵羊肺炎支原体的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0010] 其中,所述的绵羊肺炎支原体全菌蛋白制备方法为:用KM2支原体培养基培养绵羊肺炎支原体(Mo)NJ01株,经扩大培养后,收获培养物,经离心洗涤和超声处理后,获得Mo全菌蛋白作为免疫抗原,冷冻保存。所述的绵羊肺炎支原体(*Mycoplasma ovipneumoniae*,Mo)NJ01株,保藏编号为CCTCC NO:M 2020907,保藏日期为2020年12月14日,保藏地址为中国武汉武汉大学,其详细信息已公开在申请号2021103419159的中国专利中。

[0011] 其中,所述的免疫小鼠的方法为:将所述的Mo免疫原皮下多点注射免疫BALB/c小鼠(购自扬州大学比较医学中心),一共免疫3次,每次免疫间隔2周。首免免疫使用40 μ g Mo全菌蛋白与等体积完全弗氏佐剂(购自Sigma公司)乳化制备免疫原;后两次均使用40 μ g Mo全菌蛋白与等体积不完全弗氏佐剂(购自Sigma公司)乳化制备免疫原;第三次免疫2周后采血,检测小鼠的免疫血清效价,选取ELISA抗体效价 $>10^6$ 的小鼠,细胞融合前4d加强免疫一次,采用100 μ g Mo蛋白腹腔注射。

[0012] 其中,所述的细胞融合方法为:取小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)与免疫的Balb/c小鼠脾脏细胞按照1:10或1:5的比例采取PEG细胞融合方法。待融合7d后,细胞生长至96孔板孔底面积1/10~1/5时,取上清,按照间接ELISA方法进行抗体检测。选择两次检测结果均为阳性的杂交瘤细胞株进行亚克隆3次,直至克隆后所有的克隆细胞株上清检测均为阳性且各孔检测的OD₄₅₀nm值较接近。将克隆化的抗Mo特异单克隆抗体杂交瘤细胞株进行扩大培养,冻存。结果获得了1A11、1A12株和5C1单抗细胞株。将杂交瘤细胞株1A11、1A12和5C1分泌的单克隆抗体分别命名为单克隆抗体1A11、1A12和5C1。优选杂交瘤细胞株1A11。

[0013] 第二方面,本发明提供了一种如第一方面所述的杂交瘤细胞株1A11分泌获得的抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体1A11。

[0014] 其中,所述单克隆抗体1A11,其亚类重链为IgG1、轻链为 κ 。

[0015] 其中,所述单克隆抗体1A11不与其他动物支原体发生反应。所述的其他动物支原体包括但不限于猪鼻支原体、猪肺炎支原体、鸡毒支原体和牛支原体中的任意一种或多种的组合。

[0016] 其中,所述单克隆抗体1A11,其识别抗原为绵羊肺炎支原体约54kDa蛋白。

[0017] 其中,如第二方面所述的单克隆抗体1A11的制备方法为:将上述第一方面所述的杂交瘤细胞株1A11 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 注射入小鼠腹腔,7~10d后收取小鼠腹水,离心取上清,即得。

[0018] 第三方面,本发明提供了一种如上述第一方面所述的杂交瘤细胞株1A11、或者如上述第二方面所述的单克隆抗体1A11在制备检测绵羊肺炎支原体试剂和/或试剂盒中的应用。

[0019] 其中,所述的检测包括但不限于间接免疫荧光检测、免疫印迹法检测、双抗夹心ELISA检测和抗体间接ELISA等。

[0020] 第四方面,本发明提供了一种用于检测绵羊肺炎支原体抗原的双抗夹心ELISA试剂盒,所述试剂盒包括捕获抗体、检测抗体和酶标二抗;

[0021] 所述捕获抗体为如上第二方面所述的单克隆抗体1A11;

[0022] 所述检测抗体为绵羊肺炎支原体高免兔血清;

[0023] 所述酶标二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔IgG。

[0024] 其中,所述的检测抗体绵羊肺炎支原体高免兔血清,通过绵羊肺炎支原体免疫兔子获得。优选地,为绵羊肺炎支原体Y98株高免兔血清或IK3-3株高免兔血清,通过绵羊肺炎支原体Y98株或IK3-3株免疫家兔获得。更优选IK3-3株高免兔血清。其中,所述的绵羊肺炎支原体Y98株来源于国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心(保藏编号为CVCC384)。所述的绵羊肺炎支原体IK3-3株来源于国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心(保藏编号为CVCC380)。

[0025] 其中,所述的试剂盒还包括洗涤液,封闭液,底物液和终止液。

[0026] 其中,所述的洗涤液为PBST(pH=7.4)。所述的封闭液为酪蛋白、牛血清蛋白(BSA)、脱脂奶粉或明胶中的任意一种;优选地,所述的酪蛋白体积比浓度为0.5%~4%;所述的BSA的体积比浓度为0.5%~4%;所述的脱脂奶粉体积比浓度为5%~20%;所述的明胶体积比浓度为1%。更优选地,所述的封闭液为BSA,体积比浓度为1%。所述的底物液为TMB显色液;所述的终止液为2M硫酸。

[0027] 第五方面,本发明提供了一种如上第四方面所述的试剂盒在非诊断目的检测绵羊肺炎支原体中的应用。

[0028] 第六方面,本发明提供了一种非诊断目的检测绵羊肺炎支原体的双抗夹心ELISA方法,包括如下条件:单克隆抗体1A11稀释倍数为1:2.5~1:320v/v,包被条件为37℃,60min后4℃过夜或者直接4℃过夜;封闭液封闭条件为37℃,1h;待检抗原作用条件为37℃,30~120min;检测抗体稀释倍数为1:256~1:16384v/v,作用条件为37℃,30~120min;酶标二抗的稀释倍数为1:1000~1:8000v/v,作用条件为37℃,30~120min;显色时间为5~20min。优选地,单克隆抗体1A11稀释倍数为1:20v/v,包被条件为37℃1h后4℃过夜;封闭液为1%v/v BSA,封闭条件为37℃,1h;待检抗原作用条件为37℃,90min;检测抗体为绵羊肺炎支原体IK3-3株高免兔血清,稀释倍数为1:1024v/v,作用条件为37℃,120min;酶标二抗的稀释倍数为1:4000v/v,作用条件为37℃,90min;显色时间为10min。

[0029] 具体包括步骤:将单克隆抗体1A11以体积比1:2.5~1:320的比例稀释后37℃,60min后4℃过夜或直接4℃过夜包被酶标板;用封闭液进行封闭,37℃作用1h;加入待检抗原,37℃作用30~120min;加入以体积比1:256~1:16384比例稀释的检测抗体,放入温箱37℃作用30~120min;加入以体积比1:1000~1:8000比例稀释的酶标抗体,放入温箱37℃作用30~120min;加入底物液TMB显色底物显色,5~20min;加入终止液2M H₂SO₄,测定OD₄₅₀值;优选地,将单克隆抗体1A11以体积比1:20的比例稀释后包被酶标板,4℃过夜进行包被;用封闭液1%v/v BSA进行封闭,37℃作用1h;加入待检抗原,37℃反应90min,加入以体积比1:1024比例稀释的检测抗体绵羊肺炎支原体IK3-3株高免兔血清,放入温箱37℃作用120min;加入以体积比1:4000比例稀释的酶标抗体,放入温箱37℃作用90min;加入底物液TMB显色底物显色,10min;加入终止液2M H₂SO₄,测定OD₄₅₀值。

[0030] 其中,所述的待检抗原,为绵羊肺炎支原体培养物原液或者所述原液经超声裂解、硫柳汞灭活或甲醛灭活中的任意一种方式处理后的混合物体系。优选地,为培养物原液经超声裂解处理过的混合物体系。

[0031] 其中,所述的双抗夹心ELISA方法具有良好的特异性、敏感性和重复性。

[0032] 其中,所述的双抗夹心ELISA方法和CCU₅₀含量具有显著正相关。

[0033] 如上所述的试剂盒或检测方法,其检测用途包括但不限于检测Mo新鲜培养物中Mo

含量,冷藏或冷冻保存的培养物中Mo含量,灭活或浓缩物中Mo含量,疫苗或可能含有Mo的制剂或混合物中Mo含量。

[0034] 本领域技术人员可以根据常规技术手段在上述试剂盒、试剂或试纸中加入其它辅助试剂,且采用常规方法即可制备得到。

[0035] 本领域技术人员可以根据常规技术手段在上述方法关键参数的基础上,加入其它辅助试剂,且采用常规方法即可制备得到一种绵羊肺炎支原体ELISA抗原检测方法。

[0036] 本领域技术人员可以根据常规技术手段在上述方法关键参数的基础上,对其他待检物进行处理,而将用途扩大到用于其他样品的检测。

[0037] 本发明的有益效果:

[0038] (1) 特异性强:本发明筛选得到的单抗1A11和本发明建立的双抗夹心ELISA试剂盒与绵羊肺炎支原体发生特异性反应,不与猪肺炎支原体、猪鼻支原体、鸡毒支原体和牛支原体等常见动物支原体发生反应。

[0039] (2) 灵敏度高:本发明试剂盒最低可检测 1.95×10^4 CCU₅₀/mL的绵羊肺炎支原体,与CCU₅₀含量呈显著正相关。

[0040] (3) 重复性:本发明试剂盒的批内和批间重复性较好,批间和批内变异系数均低于10%。

[0041] (4) 简便快速:本发明试剂盒需求技术难度低,不需要贵重仪器,操作简便,整个检测过程不超过21h。

[0042] (5) 高通量:本发明试剂盒可以用于大量样品检测。

[0043] 因此,本发明的单克隆抗体特异性强,抗体滴度高;本发明的提出为建立一种快速、简易、准确、高通量的Mo定性和定量检测方法,以及在疫苗评价、抗原定量、病原检测、免疫功能研究等方面提供技术手段,对Mo的防控及实验室研究都具有重要意义。

附图说明

[0044] 下面结合附图和具体实施方式对本发明做更进一步的具体说明,本发明的上述和/或其他方面的优点将会变得更加清楚。

[0045] 图1为Western blot检测单克隆抗体1A11株与Mo反应的蛋白胶图。

[0046] M:蛋白质分子质量标准;1-3:Mo IK3-3、Mo NJ01、Mo Y98株全菌蛋白

具体实施方式

[0047] 下面将结合具体实施例,对本发明作进一步的说明,而非对本发明进行限制。如无特殊说明,均为常规方法;所述试剂和材料,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0048] 下列实施例中,所述的羊抗兔IgG(H+L)-HRP(即HRP标记羊抗兔IgG),购买于北京全式金生物技术股份有限公司;所述的底物液(TMB显色液)购买于湖州英创生物科技有限公司;所述的酶标板为96孔酶标板,购买于costar公司。

[0049] 下列实施例中,所述的绵羊肺炎支原体(*Mycoplasma ovipneumoniae*, Mo)NJ01株,保藏编号为CCTCC NO:M 2020907,保藏日期为2020年12月14日,保藏地址为中国武汉武汉大学,中国典型培养物保藏中心,其详细信息已公开在申请号2021103419159的中国专利中。

[0050] 下列实施例中,所述的绵羊肺炎支原体Y98株来源于国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心(保藏编号为CVCC384)。

[0051] 所述的绵羊肺炎支原体IK3-3株来源于国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心(保藏编号为CVCC380)。

[0052] 下列实施例中,所述的PBS为pH=7.4的PBS溶液。所述的PBST为pH=7.4的PBST溶液。

[0053] 实施例1抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体杂交瘤细胞株的筛选

[0054] 1. 抗原制备

[0055] 用KM2支原体培养基37℃培养绵羊肺炎支原体(Mo)NJ01株,经扩大培养后,收获培养物,经离心洗涤和200W,10min超声波处理后,获得Mo全菌蛋白作为免疫抗原,冷冻保存。

[0056] 2. 免疫Balb/c小鼠

[0057] 将Mo免疫原背部皮下4个点注射免疫6-8周龄雌性BALB/c小鼠(购自扬州大学比较医学中心),一共免疫3次,每次免疫间隔2周。首免免疫使用40μg Mo全菌蛋白与等体积完全弗氏佐剂(购自Sigma公司)乳化制备免疫原;后两次均使用40μg全菌Mo蛋白与等体积不完全弗氏佐剂(购自Sigma公司)乳化制备免疫原;第三次免疫2周后采血,检测小鼠的免疫血清效价(检测方法参照文献谢琴等.抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立[J].中国畜禽传染病,1995(04):48-50.),选取ELISA抗体效价 $>10^6$ 的小鼠,细胞融合前4d加强免疫一次,采用100μg Mo全菌蛋白腹腔注射。

[0058] 3. 细胞融合与杂交瘤细胞的筛选

[0059] 取小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)与免疫的Balb/c小鼠脾脏细胞按照1:10或1:5的比例采取PEG细胞融合方法。待融合7d后,细胞生长至96孔板孔底面积 $1/10 \sim 1/5$ 时,取上清,参考文献(杜改梅,等.绵羊肺炎支原体抗体ELISA检测方法的建立[J].畜牧与兽医,2020,52(06):107-111.)的间接ELISA方法进行抗体检测。选择两次检测结果均为阳性的杂交瘤细胞株进行亚克隆3次,直至克隆后所有的克隆细胞株上清检测均为阳性且各孔检测的OD₄₅₀值较接近。将克隆化的抗Mo特异单克隆抗体杂交瘤细胞株进行扩大培养,冻存。结果获得了1A11、1A12和5C1单抗细胞株。将杂交瘤细胞株1A11、1A12和5C1分泌的单克隆抗体分别命名为单克隆抗体1A11、1A12和5C1。

[0060] 实施例2抗体特性分析

[0061] 1. 单抗Western-blot分析

[0062] 使用SDS-PAGE凝胶电泳对Mo Y98株、IK3-3株、NJ01株全菌蛋白进行分离,然后转印至硝酸纤维素膜(NC膜),以杂交瘤细胞1A11株单抗作为一抗,以山羊抗小鼠IgG(H+L)-HRP抗体作为二抗,进行Western-blot分析。

[0063] 结果显示,如图1所示,杂交瘤细胞1A11株分泌的单抗1A11与3株绵羊肺炎支原体在54kDa左右有一明显条带,说明单抗1A11可与Mo蛋白发生免疫反应。

[0064] 2. 单抗亚类鉴定

[0065] 通过单抗亚类鉴定试剂盒(购自博奥龙公司)检测,结果显示1A11和1A12的亚类重链为IgG1、轻链为κ(表1)。

[0066] 表1单克隆抗体亚类鉴定

	亚型	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	κ	λ
[0067]	1A11	1.693	0.083	0.118	0.066	0.064	0.065	0.943	0.061
	1A12	1.669	0.066	0.122	0.064	0.063	0.064	0.911	0.064

[0068] 实施例3单克隆抗体的制备与纯化

[0069] 采用腹水制备法:将灭菌的液体石蜡腹腔注射10~12周龄的Balb/c小鼠(购自扬州大学比较医学实验中心),0.3mL/只,7d后,将杂交瘤细胞株1A11注射入小鼠腹腔,每只0.2mL($2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个杂交瘤细胞)。7~10d后收取腹部明显鼓起的小鼠的腹水,3000r/min离心20min,收集腹水上清,分装,标记并保存至-20℃备用。后续实施例中所用的单克隆抗体1A11均为腹水制备得到的。

[0070] 实施例4绵羊肺炎支原体间接免疫荧光试验

[0071] 1. 绵羊肺炎支原体感染细胞

[0072] MDBK单层细胞(购自于中国兽医药品监察所)消化后用DMEM+10%胎牛血清(FBS)细胞培养基稀释至 5×10^4 个/ml,向每96孔板中每孔加入100 μ l,置CO₂培养箱37℃培养,待细胞汇合度到80%后,进行Mo黏附试验。

[0073] 2. Mo黏附细胞

[0074] MDBK单层细胞吸取细胞上清液,将Mo菌液用细胞维持培养基稀释后,向每孔加入100 μ l稀释菌液,温箱37℃黏附6h。同时,设未感染Mo的对照细胞。待Mo黏附细胞6h后,两组细胞均弃掉原有上清,用PBS轻微洗涤细胞。每孔缓慢加入100 μ l无水乙醇,4℃固定30min;弃掉无水乙醇,每孔100 μ l PBS,洗涤3次,每次30s;每孔100 μ l含1%v/v BSAPBS的封闭液,37℃封闭1h;弃掉封闭液,用PBS洗涤3次;每孔加入100 μ l小鼠腹水单抗1A11,37℃孵育1h;弃掉一抗,用PBS洗涤3次;加入100 μ l FITC标记的羊抗小鼠IgG,避光37℃孵育1h;弃掉二抗,用PBS洗涤3次后,在荧光显微镜下观察。

[0075] 结果对照组细胞未观察到荧光,Mo感染组随着Mo感染浓度的上升,荧光量显著增加。这提示单抗1A11可用于Mo的间接免疫荧光试验。

[0076] 实施例5检测抗体绵羊肺炎支原体高免兔血清的制备和筛选方法

[0077] 1. 绵羊肺炎支原体高免兔血清的制备方法

[0078] 将绵羊肺炎支原体Y98株或IK3-3株新鲜培养物,进行12000r/min离心20min,沉淀菌体用PBS重悬后,12000r/min离心20min,如此洗涤3次,获得的绵羊肺炎支原体用PBS以1/100(v/v)进行重悬后,按200W,10min超声波破碎处理。获得的抗原参考文献(吕晋刚,抗绵羊支原体高免血清的制备,畜禽业,2013年8月,总292期,11-12页)免疫家兔制备获得绵羊肺炎支原体Y98株高免兔血清和IK3-3株高免兔血清。具体为:将获得的抗原(Mo全菌蛋白)皮下多点注射免疫家兔,一共免疫4次,每次免疫间隔2周。首免免疫使用400 μ g Mo全菌蛋白与等体积完全弗氏佐剂(购自Sigma公司)乳化制备免疫原;后三次均使用200 μ g Mo全菌蛋白与等体积不完全弗氏佐剂(购自Sigma公司)乳化制备免疫原;第四次免疫2周后采血分离血清,获得绵羊肺炎支原体高免兔血清。

[0079] 2. 绵羊肺炎支原体高免兔血清的筛选方法

[0080] 2.1 代谢抑制试验

[0081] 参考文献(孙亚波,等.不同动物高免血清对猪肺炎支原体的代谢抑制作用研究.

中国兽药杂志,2016.)的方法,用绵羊肺炎支原体(如Y98株,或IK3-3株)对绵羊肺炎支原体高免兔血清进行代谢抑制试验,结果制备的绵羊肺炎支原体Y98株高免兔血清和IK3-3株高免兔血清均可抑制绵羊肺炎支原体。

[0082] 2.2绵羊肺炎支原体双抗夹心ELISA方法检测试验

[0083] 将Mo单克隆抗体1A11稀释(稀释液为包被缓存液)后取100 μ l包被酶标板,使用PBST洗涤;用200 μ l封闭液1%v/v BSAPBS进行封闭,37 $^{\circ}$ C作用1h;PBST洗涤后,加入100 μ l待检抗原,即Mo培养物(阳性对照,P),同时设立1%BSAPBST(空白对照)和支原体培养基(阴性对照,N),37 $^{\circ}$ C作用1h;用PBST洗涤后,加入本实施例制备得到的稀释的检测抗体(绵羊肺炎支原体IK3-3株高免兔血清或绵羊肺炎支原体Y98株高免兔血清)100 μ l(稀释液为1%BSAPBST),放入温箱37 $^{\circ}$ C作用1h;用PBST洗涤后加入稀释的酶标二抗羊抗兔IgG(H+L)-HRP(稀释液为1%BSA PBST),放入温箱37 $^{\circ}$ C作用一定时间;洗涤后加入100 μ l底物液显色,10min后加入50 μ l终止液2M H₂SO₄,读数,测定OD₄₅₀值。规定P/N值 \geq 2.1为阳性,P/N<2.1为阴性。

[0084] 按照上述方法,用制备的不同绵羊肺炎支原体高免兔血清分别作为检测抗体对Mo培养物(阳性,P)和支原体培养基(阴性,N)进行检测,根据P/N最大筛选检测抗体。

[0085] 表2检测抗体筛选结果

	类别	Y98 株高免兔血清	IK3-3 株高免兔血清
[0086]	阳性 OD ₄₅₀	0.502	0.581
	阴性 OD ₄₅₀	0.098	0.102
	P/N 值	5.122	5.696

[0087] 由表2可见,IK3-3株高免兔血清的P/N值高于Y98株高免兔血清,因此,选择IK3-3株高免兔血清作为检测抗体。

[0088] 实施例6用于检测绵羊肺炎支原体抗原的双抗夹心ELISA试剂盒

[0089] 本实施例公开了用于检测绵羊肺炎支原体抗原的双抗夹心ELISA试剂盒,包括捕获抗体(单克隆抗体1A11)、检测抗体(绵羊肺炎支原体高免兔血清)和酶标二抗(羊抗兔IgG(H+L)-HRP)。

[0090] 试剂盒还包括:

[0091] 洗涤液:PBST,pH=7.4;

[0092] 封闭液:BSA;

[0093] 底物液:TMB显色液;

[0094] 终止液:2M H₂SO₄。

[0095] 实施例7绵羊肺炎支原体双抗夹心ELISA方法的建立

[0096] 本实施例所述的双抗夹心ELISA具体方法为:

[0097] 将Mo单克隆抗体1A11稀释(稀释液为包被缓存液)后取100 μ l包被酶标板,使用PBST洗涤;用200 μ l封闭液1%v/v BSAPBS进行封闭,37 $^{\circ}$ C作用1h;

[0098] PBST洗涤后,加入100 μ l待检抗原,即Mo培养物(阳性对照,P),同时设立1%BSA PBST(空白对照)和支原体培养基(阴性对照,N),37 $^{\circ}$ C作用1h;

[0099] 用PBST洗涤后,加入实施例5制备得到的稀释的检测抗体绵羊肺炎支原体IK3-3株高免兔血清100 μ l(稀释液为1%BSAPBST),放入温箱37 $^{\circ}$ C作用1h;

[0100] 用PBST洗涤后加入稀释的酶标二抗羊抗兔IgG (H+L) -HRP (稀释液为1% BSA PBST),放入温箱37℃作用一定时间;

[0101] PBST洗涤后加入100μl底物液显色,10min后加入50μl终止液2M H₂SO₄。

[0102] 测定OD₄₅₀值。规定P/N值≥2.1为阳性,P/N<2.1为阴性。

[0103] 1. 包被条件的确定

[0104] 将Mo单抗1A11以1:20 (v/v) 的比例稀释,包被至酶标板,一组选择37℃作用1h后,4℃过夜,另一组选择4℃直接过夜,按照上述双抗夹心ELISA具体方法进行进行实验,选择合适的包被条件。

[0105] 表3包被条件

	类别	4℃过夜	37℃1h后4℃过夜
[0106]	阳性 OD ₄₅₀	1.046	1.093
	阴性 OD ₄₅₀	0.140	0.144
	P/N 值	7.471	7.590

[0107] 如表3所示,根据P/N值选择37℃1h后4℃过夜进行包被。

[0108] 2. 单抗最佳包被浓度及检测抗体稀释倍数的确定

[0109] 按照上述双抗夹心ELISA方法进行实验,其中Mo 1A11单抗以体积比1:2.5、1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160和1:320的稀释倍数加入酶标板,37℃作用1h后,4℃过夜。其中,检测抗体以体积比1:256、1:1024、1:4096、1:16384的比例稀释。

[0110] 测定OD₄₅₀值,将P/N最大值作为最佳包被抗体稀释度和检测抗体最佳稀释度。

[0111] 表4抗体包被浓度与检测抗体作用浓度

	包被抗体 稀释倍数	检测抗体稀释倍数							
		1:256		1:1024		1:4096		1:16384	
		阳性 OD ₄₅₀	阴性 OD ₄₅₀						
[0112]	1:2.5	0.922	0.156	0.574	0.097	0.184	0.071	0.166	0.071
	P/N 值	5.910		5.918		2.592		2.338	
	1:5	0.874	0.150	0.566	0.0902	0.188	0.071	0.189	0.075
	P/N 值	5.827		6.275		2.648		2.520	
	1:10	0.975	0.149	0.501	0.090	0.177	0.066	0.189	0.068
	P/N 值	6.544		5.567		2.682		2.779	
[0113]	1:20	0.890	0.138	0.610	0.083	0.205	0.068	0.186	0.071
	P/N 值	6.449		7.349		3.015		2.620	
	1:40	0.952	0.142	0.576	0.088	0.203	0.068	0.200	0.070
	P/N 值	6.704		6.545		2.985		2.857	
	1:80	0.983	0.327	0.622	0.262	0.309	0.237	0.274	0.238
	P/N 值	3.006		2.374		1.304		1.151	
[0114]	1:160	0.996	0.286	0.613	0.217	0.272	0.180	0.257	0.182
	P/N 值	3.483		2.825		1.511		1.412	
	1:320	0.974	0.202	0.638	0.130	0.222	0.106	0.220	0.104
	P/N 值	4.822		4.908		2.094		2.115	

[0114] 如表4所示,根据P/N值选择单抗1A11最佳包被浓度为1:20,最佳检测抗体稀释倍数为1:1024。

[0115] 3. 封闭液的筛选

[0116] 按照上述双抗夹心ELISA的方法和筛选得到的条件,选择不同体积比浓度的酪蛋白(4%、2%、1%和0.5%)、牛血清蛋白BSA(4%、2%、1%和0.5%)、脱脂奶粉(20%、10%和5%)和明胶(1%)作为封闭液进行封闭。

[0117] 表5封闭液筛选

类别	封闭液种类											
	酪蛋白				BSA				脱脂奶粉			明胶
	4%	2%	1%	0.5%	4%	2%	1%	0.5%	20%	10%	5%	1%
[0118] 阳性 OD ₄₅₀	0.721	0.796	0.852	0.963	0.635	0.649	0.713	0.668	0.464	0.607	0.778	0.135
阴性 OD ₄₅₀	0.189	0.238	0.312	0.361	0.171	0.148	0.151	0.153	0.107	0.132	0.202	0.527
P/N 值	3.815	3.345	2.731	2.668	3.713	4.385	4.722	4.366	4.336	4.598	3.851	0.256

[0119] 如表5所示,根据P/N值选择1%BSA为最佳封闭液。

[0120] 4. 夹心待测抗原作用时间的确定

[0121] 按照上述双抗夹心ELISA的方法和筛选得到的条件,其中,待测抗原的夹心作用时间选择30、60、90和120min四个时间,根据P/N值选择待测抗原最佳的作用时间。

[0122] 表6夹心待测抗原时间

类别	夹心待测抗原作用时间			
	30min	60min	90min	120min
[0123] 阳性 OD ₄₅₀	0.583	0.823	0.927	1.043
阴性 OD ₄₅₀	0.137	0.134	0.132	0.149
P/N 值	4.255	6.142	7.023	7.000

[0124] 如表6所示,根据P/N值选择90min为最佳夹心抗原作用时间。

[0125] 5. 检测抗体最佳作用时间

[0126] 按照上述双抗夹心ELISA的方法和筛选得到的条件,将检测抗体作用时间选择30、60、90和120min四个时间,根据P/N值选择检测抗体最佳的作用时间。

[0127] 表7检测抗体作用时间

类别	检测抗体作用时间			
	30min	60min	90min	120min
[0128] 阳性 OD ₄₅₀	0.549	0.685	0.774	0.941
阴性 OD ₄₅₀	0.092	0.100	0.119	0.129
P/N 值	5.967	6.850	6.504	7.295

[0129] 如表7所示,根据P/N值选择120min为最佳检测抗体作用时间。

[0130] 6. 酶标二抗稀释度及作用时间

[0131] 按照以上筛选的各项条件,将酶标二抗作用时间选择30、60、90和120min四个时间,其他条件一致,根据P/N值选择酶标二抗最佳的作用时间,根据酶标二抗最佳作用时间,酶标二抗稀释度选择体积比1:1000、1:2000、1:4000、1:8000四个稀释度,进行检测,根据P/N值选择酶标抗体的最佳稀释度。

[0132] 表8酶标二抗作用时间

	类别	作用时间			
		30min	60min	90min	120min
[0133]	阳性 OD ₄₅₀	0.74	0.821	1.105	1.287
	阴性 OD ₄₅₀	0.113	0.132	0.14	0.184
	P/N 值	6.549	6.220	7.893	6.995

[0134] 如表8所示,根据P/N值选择90min为最佳酶标二抗作用时间。

[0135] 表9酶标二抗浓度

	类别	酶标二抗浓度			
		1: 1000	1: 2000	1: 4000	1: 8000
[0136]	阳性 OD ₄₅₀	1.403	1.195	0.991	0.763
	阴性 OD ₄₅₀	0.263	0.207	0.144	0.123
	P/N 值	5.335	5.773	6.882	6.203

[0137] 如表9所示,根据P/N值选择1:4000为最佳酶标二抗浓度。

[0138] 7. 底物显色时间

[0139] 按照以上筛选的各项条件,选择5、10、15和20min四个时间进行底物显色反应,根据P/N值选择底物的最佳显色时间。

[0140] 表10显色时间

	类别	显色时间			
		5min	10min	15min	20min
[0141]	阳性 OD ₄₅₀	0.761	0.991	1.484	1.848
	阴性 OD ₄₅₀	0.143	0.144	0.274	0.332
	P/N 值	5.322	6.882	5.416	5.566

[0142] 如表10所示,选择10min为最佳显色时间。

[0143] 综上所述试验结果,最优作用条件为:将Mo 1A11单抗以体积比1:20的比例稀释,37℃ 60min后4℃过夜进行包被,用1% v/v BSA封闭。待检抗原37℃反应90min,检测抗体按体积比1:1024倍稀释,37℃反应120min;酶标抗体按体积比1:4000倍稀释,37℃作用90min,底物显色10min。

[0144] 实施例8绵羊肺炎支原体双抗夹心ELISA方法用于检测不同方法处理的样品

[0145] 按照以上筛选的各项条件,待检抗原选择培养物原液、超声裂解、硫柳汞灭活、甲醛灭活四种处理方式进行检测,选择最佳样品处理方法。

[0146] 表11样品处理条件

	类别	硫柳汞灭活	甲醛灭活	原液	超声裂解
[0147]	阳性 OD ₄₅₀	0.558	0.544	0.692	1.191
	阴性 OD ₄₅₀	0.152	0.169	0.136	0.177
	P/N 值	3.671	3.219	5.088	6.729

[0148] 由表11可见,绵羊肺炎支原体双抗夹心ELISA方法可用于检测不同方法处理的样品,根据P/N值选择将样品超声后进行检测最为灵敏。

[0149] 实施例9绵羊肺炎支原体双抗夹心ELISA方法的特性评估

[0150] 1. 特异性试验

[0151] 按照以上筛选的各项条件,选择猪鼻支原体、猪肺炎支原体、鸡毒支原体、牛支原

体、Mo、大肠杆菌、KM2培养基、MTB培养基和猪血清进行检测。

[0152] 表12特异性

类别	阳性 OD ₄₅₀	阴性 OD ₄₅₀	P/N 值
Mo (NJ01)	0.93	0.158	5.886
Mo (Y98)	0.87	0.151	5.762
猪肺炎支原体	0.103	0.146	0.705
猪鼻支原体	0.169	0.146	1.158
[0153] 鸡毒支原体	0.122	0.109	1.119
牛支原体	0.193	0.116	1.664
大肠杆菌	0.265	0.154	1.721
KM2 培养基	0.094	0.098	0.959
MTB 培养基	0.133	0.134	0.993
猪血清	0.161	0.154	1.045

[0154] 利用建立的双抗夹心ELISA对Mo、猪肺炎支原体、猪鼻支原体、鸡毒支原体、牛支原体、大肠杆菌、KM2培养基、MTB培养基和猪血清进行检测,结果显示只对Mo检测P/N>2.1,其余P/N均<2.1,表明建立的方法有较好的特异性。

[0155] 2. 敏感性测定

[0156] 新鲜收获的NJ01株,CCU为 5×10^6 CCU₅₀/mL,超声后利用上述建立的双抗夹心ELISA方法进行检测。

[0157] 表13敏感性

稀释倍数	阳性 OD ₄₅₀	P/N
1	1.599	8.551
1:2	1.549	8.283
1:4	1.468	7.850
1:8	1.389	7.428
[0158] 1:16	1.186	6.342
1:32	0.956	5.112
1:64	0.818	4.374
1:128	0.534	2.856
1:256	0.406	2.171
培养基 (N)	0.187	/

[0159] 由表13可以得出,当CCU为 5×10^6 CCU₅₀/mL的NJ01株的稀释倍数为1:256时,利用所述的双抗夹心ELISA方法进行检测,P/N值仍然大于2.1,此时NJ01株的浓度为 1.95×10^4 CCU₅₀/mL。因此,本发明建立的检测绵羊肺炎支原体的双抗夹心ELISA方法的最低检测限在 1.95×10^4 CCU₅₀/mL以下。

[0160] 3. 重复性试验

[0161] 按照以上筛选的各项条件,选择6批培养物进行板间和板内的重复。

[0162] 表14板间重复和板内重复

培养物 编号	板内重复实验			板间重复实验			
	平均值	标准差	变异系数	平均值	标准差	变异系数	
	\bar{x}	SD	CV/%	\bar{x}	SD	CV/%	
[0163]	1	1.248	0.025	2.00	1.249	0.017	1.35
	2	1.149	0.056	4.87	1.142	0.021	1.86
	3	1.047	0.026	2.48	1.050	0.009	0.89
	4	0.923	0.060	6.50	0.930	0.039	4.18
	5	0.706	0.021	2.97	0.706	0.019	2.68
	6	0.597	0.041	6.87	0.597	0.039	0.65

[0164] 板内变异系数(CV)为2%-6.87%,板间变异系数为0.65%-4.18%,说明建立的ELISA方法重复性好,检测结果稳定。

[0165] 实施例10绵羊肺炎支原体双抗夹心ELISA方法的应用

[0166] 将该方法用于检测10批新鲜培养的Mo培养物,培养物同时测定CCU含量,对结果进行相关性分析。

[0167] 表15培养物检测

	批号	P/N 值	CCU ₅₀
[0168]	1	8.69	8.5
	2	7.847	7.5
	3	7.968	7.5
	4	7.923	7.5
	5	7.798	7.5
	6	7.611	7.25
[0169]	7	6.918	7.0
	8	6.629	6.5
	9	5.875	6
	10	5.599	5.5

[0170] 对新鲜培养物用建立的双抗夹心ELISA方法和CCU₅₀含量测定,结果经Pearson相关性分析,结果显示,皮尔逊相关系数为0.986,具有显著正相关,由此,建立计算公式。

[0171] 对培养的5批次培养物应用本发明建立的双抗夹心ELISA方法进行含量测定,同时进行CCU₅₀含量测定,结果如表16,结果可见,用本发明所述的双抗夹心ELISA方法检测结果计算的CCU₅₀与实测的CCU₅₀相差较小,最小相差0.027。结果显示,建立的双抗夹心ELISA方法检测结果与CCU₅₀测定有良好的线性关系,因此,可用该双抗夹心ELISA方法代替CCU₅₀方法来测定Mo的相对CCU₅₀含量。表16绵羊肺炎支原体双抗夹心ELISA和CCU₅₀测定结果。

[0172] 表16绵羊肺炎支原体双抗夹心ELISA和CCU₅₀测定结果

	批次	双抗夹心 ELISA 方法	CCU ₅₀ 测定
		Log CCU ₅₀	Log CCU ₅₀
[0173]	1	7.426	7.500
	2	6.735	7.000
	3	6.834	7.000
	4	6.541	6.500
	5	5.973	6.000

[0174] 近几年我国对绵羊支原体肺炎的血清学调查结果显示,Mo在全国的各个地区的都有感染的情况,高感染地区的阳性率甚至超过了70%,这意味着,Mo在我国绵羊群体中存在是一个很大的数字。Mo容易与其他病原体混合或继发感染,导致死亡率上升,Mo的感染严重阻碍了我国羊养殖业的发展。因此Mo定量检测就十分重要了,目前支原体的培养定量主要使用CCU和CFU进行活菌计数,CCU和CFU计数存在收获时间点难把握,费时费力,标准化不足并且容易污染的情况,因此,探索一种快速、准确、灵敏的ELISA方法来检测Mo抗原,对于支原体的检测和诊断具有重要意义。在实际应用中,双抗夹心ELISA已被用于多种支原体的检测,包括猪肺炎支原体、猪鼻支原体和猪嗜血支原体等。此外,该方法也被用于新型冠状病毒抗原的检测,显示出高灵敏度和适用性通过优化实验条件和建立标准化的实验流程,可以更准确地检测支原体抗原,从而提高支原体感染的诊断水平。

[0175] 本发明提供了一种分泌抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其单抗与应用的思路及方法,具体实现该技术方案的方法和途径很多,以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。本实施例中未明确的各组成部分均可用现有技术加以实现。

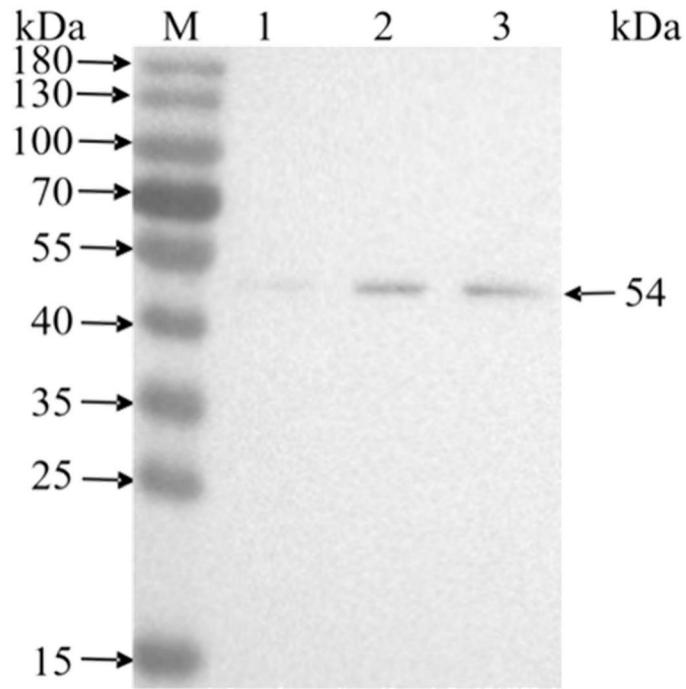


图1