



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 117683127 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 26

(21) 申请号 202311651590.X

(22) 申请日 2023.12.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117683127 A

(43) 申请公布日 2024.03.12

(83) 生物保藏信息
CCTCC NO:C2023148 2023.11.02
CCTCC NO:C2023309 2023.11.02

(73) 专利权人 华中农业大学
地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72) 发明人 方六荣 潘永光 肖少波 彭旋
廖树森 周艳荣 方谱县

(74) 专利代理机构 郑州大通专利商标代理有限公司 41111
专利代理师 栗丹

(51) Int.Cl.
C07K 16/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2023192894 A1, 2023.06.22
CN 104862285 A, 2015.08.26
审查员 蒲恒

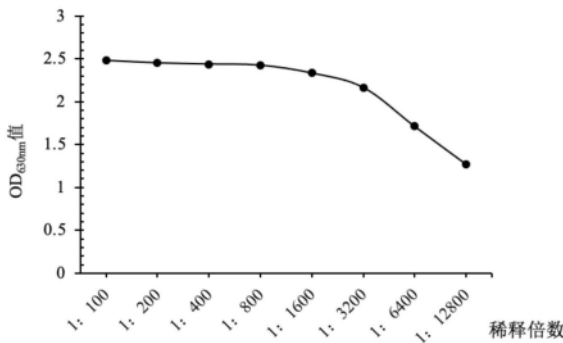
权利要求书1页 说明书15页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

猪流行性腹泻病毒抗体捕获ELISA检测试剂盒

(57) 摘要

本发明属于动物免疫学技术领域,涉及猪流行性腹泻病毒抗体捕获ELISA检测试剂盒。本发明以PEDV S1蛋白的单克隆抗体S13A8作为包被抗体,PEDV S1蛋白作为抗原,建立了检测猪血清中PEDV抗体的捕获ELISA方法,并组装成试剂盒。单克隆抗体S13A8重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的序列分别为GDSITSGY、ISFSGST、ARPDYDGYFAY;轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的序列分别为QEISGY、AAS、LQYASYPLT。本发明试剂盒适用于临床样品的大规模检测,可为PEDV感染的临床诊断、疫苗免疫效果评价和流行病学调查等提供新的检测手段。



1. 猪流行性腹泻病毒S1蛋白单克隆抗体,其特征在于,该单克隆抗体的重链可变区包括氨基酸序列为GDSITSGY的CDR1、氨基酸序列为ISFSGST的CDR2、氨基酸序列为ARPDYDGYFAY的CDR3;轻链可变区包括氨基酸序列为QEISGY的CDR1、氨基酸序列为AAS的CDR2、氨基酸序列为LQYASYPLT的CDR3。

2. 根据权利要求1所述的猪流行性腹泻病毒S1蛋白单克隆抗体,其特征在于,单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列分别如SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8所示。

3. 编码权利要求1或2所述的猪流行性腹泻病毒S1蛋白单克隆抗体的基因。

4. 根据权利要求3所述的基因,其特征在于,单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区的基因序列分别如SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7所示。

5. 包含权利要求3所述的基因的重组表达载体。

6. 包含权利要求5所述的重组表达载体的宿主细胞。

7. 分泌权利要求1或2所述的单克隆抗体的杂交瘤细胞,其特征在于,所述杂交瘤细胞的保藏编号为:CCTCC NO:C2023148。

8. 权利要求1或2所述单克隆抗体、权利要求3或4所述的基因、权利要求5所述的重组表达载体、权利要求6所述的宿主细胞、权利要求7所述的杂交瘤细胞在制备评价猪流行性腹泻病毒感染或免疫状态的试剂或试剂盒中的应用。

9. 猪流行性腹泻病毒抗体捕获ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒将权利要求1或2所述的单克隆抗体作为包被抗体,将猪流行性腹泻病毒S1蛋白作为抗原。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒,其特征在于,所述猪流行性腹泻病毒S1蛋白由CHO-PEDV S1细胞表达,所述CHO-PEDV S1细胞的保藏编号为:CCTCC NO:C2023309。

猪流行性腹泻病毒抗体捕获ELISA检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于动物免疫学技术领域,具体涉及一种检测猪流行性腹泻病毒抗体的捕获ELISA试剂盒。

背景技术

[0002] 猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea,PED)是由猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus,PEDV)引起的一种高度传染性的肠道疾病,临床上以感染猪的呕吐、厌食、腹泻、脱水为主要特征,各日龄猪均对PEDV易感,但以10日龄以内新生仔猪的发病率和死亡率最高,可达100%。

[0003] 快速准确的诊断对有效防控PED至关重要。目前PEDV的诊断方法可分为分子生物学诊断方法和血清学诊断方法两大类,分子生物学诊断方法主要有逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、实时RT-PCR(qRT-PCR)和环介导的等温扩增技术(LAMP)等,用于检测样品中的病毒核酸。血清学诊断方法主要有间接免疫荧光试验(IFA)、病毒中和试验(SNT)和酶联免疫吸附试验(ELISA)等,用于检测血清中的PEDV抗体。根据抗体的检测结果可确定PEDV的免疫暴露史、监测疫苗的有效性与免疫持续时间。其中ELISA方法具有检测速度快、成本低、敏感性高、特异性强、可同时检测大量样品等优点而被广泛应用。

[0004] 目前检测PEDV抗体的ELISA方法多是以原核表达的N蛋白为包被抗原建立的间接ELISA,虽然针对N蛋白的抗体水平高,但其不具有中和活性,对N蛋白抗体的检测不能反映机体保护性抗体的水平。而S蛋白的S1区域是诱导机体保护性免疫应答的主要区域,针对该区域的特异抗体水平能够反映疫苗免疫保护水平和机体抗感染免疫水平。同时,现有的检测PEDV抗体的ELISA方法所用的包被抗原多为原核表达的蛋白,由于其不具有蛋白质的天然构象,从而会影响ELISA方法的灵敏性和特异性。

发明内容

[0005] 本发明目的在于提供一种检测猪流行性腹泻病毒抗体的抗体捕获ELISA试剂盒及其在评价PEDV感染及免疫状态中的应用。本发明以PEDV S1蛋白的单克隆抗体包被酶标板,捕获PEDV S1蛋白,建立了检测PEDV抗体的捕获ELISA方法,与间接ELISA相比,该方法还可以避免抗原包被时非特异性蛋白的吸附,从而进一步提高检测的特异性。

[0006] 本发明采用以下技术方案:

[0007] 1、重组PEDV S1蛋白的制备

[0008] 本发明通过将编码PEDV S1亚基的基因克隆至真核表达载体pXC17.4中,获得重组表达质粒pXC17.4-S1。将质粒pXC17.4-S1转染至CHO-K1细胞,成功构建表达PEDV S1蛋白的CHO细胞株,将其命名为CHO-PEDV S1,CHO-PEDV S1细胞株的保藏号为CCTCC NO:C2023309。

[0009] CHO-PEDV S1细胞株表达的PEDV S1蛋白主要存在于细胞上清中,收获细胞上清通过亲和层析Ni柱纯化得到高纯度的PEDV S1蛋白。

[0010] 2、PEDV S1蛋白特异性单克隆抗体的制备

[0011] 将纯化的PEDV S1蛋白与佐剂等体积混匀后,经腿部肌肉注射4~6周龄雌性BALB/c小鼠,加强免疫后,分离小鼠脾细胞,与小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)进行融合、培养,将检测为阳性的细胞进行扩大培养后进行IFA验证。最终获得6株分泌PEDV S1蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞。6株杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体中5株为IgG1亚型、1株为IgG2a亚型,轻链亚型均为 κ ,所有单克隆抗体均能与PEDV感染的Vero细胞发生特异性反应。

[0012] 本发明通过对6株单克隆抗体的比较,最终确定将单克隆抗体S13A8作为本发明的抗体捕获ELISA检测试剂盒的包被抗体。单克隆抗体S13A8由杂交瘤细胞株S13A8分泌,杂交瘤细胞株S13A8的保藏号为CCTCC NO:C2023148。

[0013] 所述的单克隆抗体S13A8的重链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,包括氨基酸序列为GDSITSGY的CDR1、氨基酸序列为ISFSGST的CDR2、氨基酸序列为ARPDYDGYFAY的CDR3;轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示,包括氨基酸序列为QEISGY的CDR1、氨基酸序列为AAS的CDR2、氨基酸序列为LQYASYPLT的CDR3。

[0014] 3、检测猪流行性腹泻病毒抗体的抗体捕获ELISA方法的建立

[0015] 本发明将单克隆抗体S13A8作为包被抗体,将CHO-PEDV S1细胞株表达的S1蛋白作为抗原建立抗体捕获ELISA方法,可特异性地检测待检血清中的PEDV抗体。本发明提供的检测猪流行性腹泻病毒抗体的捕获ELISA试剂盒,包括以下组分:预制酶标板、20 $\times$ 浓缩洗涤液、血清稀释液、辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗猪IgG、底物液A、底物液B、终止液、阴性血清对照、阳性血清对照。

[0016] 具体优选地,所述试剂盒各组分的具体组成为:

[0017] (1) 预制酶标板:将单克隆抗体S13A8包被酶标板,加入PEDV S1蛋白进行孵育,风干后用铝箔袋密闭封装,置于2~8 $^{\circ}$ C保存;

[0018] (2) 20 $\times$ 浓缩洗涤液:160gNaCl,4g KCl,71.6g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,5.4g KH_2PO_4 ,10mL Tween-20,0.2g硫柳汞钠,加去离子水溶解并定容至1L,分装,100mL/瓶;

[0019] (3) 血清稀释液:10gBSA,8gNaCl,0.2g KCl,3.58g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.27g KH_2PO_4 ,0.5mL Tween-20,0.2g硫柳汞钠,加去离子水溶解并定容至1L,分装,100mL/瓶;

[0020] (4) 辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗猪IgG:将商品化的HRP标记的兔抗猪IgG(购自北京博奥森生物技术有限公司)用含0.05% Tween-20的0.01mol、pH 7.4的PBS稀释10000倍,经0.22 μm 滤膜过滤除菌,分装,70mL/瓶;

[0021] (5) 底物液A:14.6g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,9.33g柠檬酸,0.52g过氧化氢脲,加去离子水溶解并定容至1L,调pH至5.0~5.4,用0.22 μm 滤膜过滤除菌,分装,50mL/瓶;

[0022] (6) 底物液B:20mg四甲基联苯二胺,10mL无水乙醇,加去离子水溶解并定容至1L,0.22 μm 滤膜过滤除菌,分装,50mL/瓶;

[0023] (7) 终止液:2.5mL氢氟酸加到900mL去离子水中,定容至1L,用0.22 μm 滤膜过滤除菌,分装,50mL/瓶;

[0024] (8) 阴性血清对照:3mL/瓶;

[0025] (9) 阳性血清对照:3mL/瓶。

[0026] 本发明所述的试剂盒在检测猪流行性腹泻病毒抗体时的操作步骤:

[0027] (1) 取出试剂盒,室温下放置30min;将20 $\times$ 浓缩洗涤液用去离子水按所需量稀释

成1×洗涤液备用;回温的同时将待检血清样品用试剂盒中的血清稀释液作1:40稀释。

[0028] (2) 取出所需数量的预制酶标板条,每次检测设空白对照孔1孔,阴性、阳性血清对照孔各2孔;空白对照孔内加血清稀释液100 μ L,阴性、阳性血清对照孔分别加入阴性、阳性血清对照100 μ L,样品孔每孔加入稀释后的样品100 μ L。

[0029] (3) 37 $^{\circ}$ C孵育45min;甩弃酶标板中的液体后在吸水纸上拍干,每孔加入250 μ L洗涤液洗板3次,每次5min。

[0030] (4) 每孔加入100 μ L HRP标记的兔抗猪IgG,37 $^{\circ}$ C孵育1h;甩弃酶标板中的液体后在吸水纸上拍干,每孔加入250 μ L洗涤液洗板3次,每次5min。

[0031] (5) 每孔依次加入50 μ L底物液A和50 μ L底物液B,避光反应5min后加入50 μ L终止液。

[0032] (6) 在酶标仪中读取OD_{630nm}值,计算S/P值, $S/P值 = (待检样品OD_{630nm} - 阴性血清对照OD_{630nm}) / (阳性血清对照OD_{630nm} - 阴性血清对照OD_{630nm})$ 。

[0033] (7) 结果判定:参考值:空白对照OD_{630nm}值应 <0.05 ,阴性对照孔的OD_{630nm}值 ≤ 0.3 ,阳性对照孔OD_{630nm}值应 ≥ 0.5 。根据样品S/P值对其进行阴阳性判定,当S/P值 ≥ 0.147 时判定为阳性,当S/P值 <0.083 时判定为阴性,当 $0.083 \leq S/P值 < 0.147$ 时判定为可疑,需要重新检测,再次检测时S/P值 ≥ 0.083 时判定为阳性,S/P值 <0.083 时判定为阴性。

[0034] 本发明中的猪流行性腹泻病毒抗体捕获ELISA试剂盒的核心试剂包括杂交瘤细胞株S13A8分泌的单克隆抗体,重组PEDV S1蛋白,预制酶标板,以及其他试剂包括:洗涤液、血清稀释液、辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗猪IgG、底物液A、底物液B、终止液、阳性血清对照和阴性血清对照,该试剂盒按本领域的公知常识组装。

[0035] 本发明具有以下有益效果:

[0036] (1) 相比将原核系统表达的PEDV N蛋白、PEDV S1蛋白作为抗原,本发明通过哺乳动物细胞表达系统(CH0-K1细胞)制备的PEDV S1蛋白具有免疫原性好、纯度高,更接近病毒蛋白天然构象等优点。

[0037] (2) 通过比较,单克隆抗体S13A8是本发明制备的6株PEDV S1蛋白单克隆抗体中检测效果最佳的一株,因此本发明选择将其作为包被抗体。

[0038] (3) 检测血清中的抗体时,相比直接包被抗原的间接ELISA方法,本发明采用先包被抗体,再捕获蛋白作为抗原的抗体捕获ELISA方法,可以减少抗原中杂质蛋白的吸附,有效地降低非特异性反应。

[0039] (4) 本发明建立的检测方法及其试剂盒特异性强、灵敏性高、重复性好、所需样品量少、操作便捷,且与PEDV血清中和试验的符合率高,适用于临床样品的大规模检测。

附图说明

[0040] 图1是pXC17.4载体和目的基因双酶切后琼脂凝胶电泳检测图。M:DL5000 DNA Marker;1:pXC17.4载体;2:目的基因。

[0041] 图2是通过CH0-PEDV S1细胞株表达重组PEDV S1蛋白的SDS-PAGE电泳检测图(A)及WesternBlot检测图(B)。M:Protein Marker;1:转染pXC17.4-S1的细胞上清;2:转染pXC17.4-S1的细胞沉淀;3:未转染质粒的细胞上清;4:未转染质粒的细胞沉淀。

[0042] 图3是通过亲和层析Ni柱纯化后的重组PEDV S1蛋白的SDS-PAGE电泳检测图。M:Protein Marker;1:PEDV S1蛋白。

- [0043] 图4是包被抗体S13A8饱和浓度的测定结果。
- [0044] 图5是pXC17.4载体图谱。
- [0045] 图6是6株杂交瘤细胞分泌的PEDV S1蛋白单克隆抗体的IFA鉴定图。
- [0046] 保藏信息
- [0047] 保藏的生物材料:杂交瘤细胞株S13A8
- [0048] 保藏时间:2023年11月2日;
- [0049] 保藏单位名称:中国典型培养物保藏中心;
- [0050] 保藏编号:CCTCC NO:C2023148;
- [0051] 保藏单位地址:中国,武汉,武汉大学;
- [0052] 分类命名:杂交瘤细胞株S13A8(Hybridoma cell line S13A8)。
- [0053] 保藏的生物材料:CHO-PEDV S1细胞
- [0054] 保藏时间:2023年11月2日;
- [0055] 保藏单位名称:中国典型培养物保藏中心;
- [0056] 保藏编号:CCTCC NO:C2023309;
- [0057] 保藏单位地址:中国,武汉,武汉大学;
- [0058] 分类命名:中国仓鼠卵巢细胞CHO-PEDV S1。

具体实施方式

[0059] 下面通过具体实施方式对本发明进行更加详细的说明,以便于对本发明技术方案的理解,但并不用于对本发明保护范围的限制。

[0060] 实施例1:猪流行性腹泻病毒S1蛋白的表达与纯化

[0061] 1. PEDV S1基因的克隆和重组表达质粒的构建

[0062] 根据CHO-K1细胞的密码子偏爱性,对PEDV AJ1102株S1基因的密码子进行优化,并合成优化后的S1基因,将合成的S1基因连接至质粒pUC-57中,得到含有该优化基因的质粒pUC-S1。优化后的S1基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,优化后的S1基因编码的蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0063] 以质粒pUC-S1为模板,利用引物对F1 (CTGCTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACAGG ACTGCCTCAGGACGTG) 和R (CGGAATTCTCAATGGTGATGGTGATGAGAAAAA TTAGTAGG),引物中引入了EcoRI酶切位点和6×His标签序列)进行扩增,反应体系和扩增条件分别见表1和表2,获得大小为2372bp的片段。回收PCR产物作为模板,以引物对F2 (TCCCCCGGGGATGGAAACAGATACACTCCTCTCTGGGTGCTGCTCCTCTG GGTG,引物中引入了SmaI酶切位点) 和R进行PCR扩增,反应体系和扩增条件分别见表3和表2,获得大小为2413bp的含鼠Ig kappa信号肽序列(该信号肽的核苷酸序列:ATGGAAACAGATACACTCCTCTCTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGA,如SEQ ID NO:3所示;该信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示)的S1基因。将其回收后用限制性内切酶SmaI和EcoRI进行双酶切,同时对载体pXC17.4进行同样的酶切,pXC17.4载体和目的基因双酶切后琼脂凝胶电泳检测结果见图1。回收酶切产物,用T4DNA连接酶进行连接,将连接产物转化DH5α感受态细胞,挑取单个菌落扩大培养后提取质粒并送公司测序,将测序正确的重组质粒命名为pXC17.4-S1。

[0064] 表1第一次PCR反应体系

[0065]	试剂	体积
	5×PS Buffer	10μL
	dNTPs	4μL
	Primer Star	1μL
	Primer F1	1μL
	Primer R	1μL
	Template (pUC-S1)	1μL
	DEPC H ₂ O	32μL
	Total	50μL

[0066] 表2 PCR反应条件

[0067]	温度	时间	循环数
	94°C	5min	——
	98°C	13 s	34
	56°C	15 s	
	72°C	2.5 min	
	72°C	10 min	——
	4°C	∞	——

[0068] 表3第二次PCR反应体系

[0069]	试剂	体积
	5×PS Buffer	10μL
	dNTPs	4μL
	Primer Star	1μL
	Primer F2	1μL
	Primer R	1μL
	PCR回收产物	1μL
	DEPC H ₂ O	32μL
	Total	50μL

[0070] 2. 表达PEDV S1蛋白的CHO-K1细胞株的构建

[0071] 将CHO-K1细胞以 2×10^5 cells/mL的密度接种于锥形瓶中,加入添加有4mM谷氨酰胺的CD-CHO-AGT(购自ThermoFisher公司)培养基,于37°C含5% CO₂摇床110rpm悬浮培养。当细胞密度达到 2×10^6 cells/mL~ 5×10^6 cells/mL,且活细胞所占比率高于90%时,将重组表达质粒pXC17.4-S1通过电转导入CHO-K1宿主细胞,电转后加入压力筛选培养基(50μM MSX)中培养7~10d。取1mL细胞悬液4000rpm离心15min,收集细胞上清,并用1mL PBS (0.01mol磷酸盐缓冲液,pH 7.4)重悬细胞沉淀,对上清样品和沉淀样品同时进行SDS-PAGE电泳和WesternBlot检测,WesternBlot检测中所用一抗为抗His标签的抗体(购自北京博尔迈生物技术有限公司),同时以相同条件培养的未转染质粒的CHO-K1细胞上清和细胞沉淀作为对照,结果显示PEDV S1蛋白在CHO-K1细胞中正确表达,并主要存在于细胞上清中(图2),说明表达PEDV S1蛋白的细胞株构建成功,将其命名为CHO-PEDV S1细胞。

[0072] 3. PEDV S1蛋白的大量表达与纯化

[0073] 将表达PEDV S1蛋白的细胞株CHO-PEDV S1以 2×10^5 cells/mL的密度接种于含有

1L培养基 (VegaCHO) 的锥形瓶中,于37℃含5% CO₂摇床110rpm悬浮培养。收获细胞悬液,4000rpm离心15min收集上清,用0.45μm滤膜过滤后,再用Ni柱进行亲和层析纯化,SDS-PAGE电泳检测证实目的条带单一,灰度分析显示目的蛋白占总蛋白的97.26% (图3),说明获得了纯度较好的目的蛋白。采用BCA蛋白定量试剂盒 (购自碧云天生物公司) 测定蛋白浓度后分装保存于-80℃。

[0074] 实施例2: PEDV S1蛋白单克隆抗体的制备

[0075] (1) 将实施例1表达并纯化的PEDV S1蛋白与佐剂 (QuickAntibody-Mouse5W, Biodragon) 等体积混匀后,经腿部肌肉注射4~6周龄雌性BALB/c小鼠,每只小鼠100μL (20μg)。首免后21d,按相同方式进行二免。

[0076] (2) 二免后14d对小鼠进行断尾采血,分离血清。以表达的PEDV S1蛋白包被ELISA板通过间接ELISA方法 (PEDV S1-ELISA) 测定小鼠血清中的抗体,当血清抗体效价大于1:128000时,通过腹腔注射的方式对小鼠进行加强免疫;若抗体效价未达到1:128000时,则仍通过腿部肌肉注射的方式进行第三次免疫。

[0077] (3) 在加强免疫3d后,无菌分离小鼠脾细胞,与小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 进行融合,融合后先用含HAT的完全培养基培养4~5d,再换成含HT的完全培养基继续培养。

[0078] (4) 当细胞集落长至孔底面积的1/4时,通过PEDV S1-ELISA对细胞上清进行检测,将检测为阳性的细胞转移至48孔板进行扩大培养,收集细胞上清作为一抗,对PEDV感染的Vero细胞进行IFA验证,结果表明共有6株杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体有特异性荧光 (图6)。采用有限稀释法进行2~3轮克隆,最终获得6株分泌PEDV S1蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞,将其分别命名为S3G1、S3G5、S5F4、S7B3、S13A8和S14A7。收集单抗细胞培养上清,通过商品化单抗亚类鉴定试剂盒 (购自北京博奥龙免疫技术有限公司) 进行抗体亚型鉴定,结果显示除S7B3的重链类型为IgG2a,其余5株单抗的重链类型均为IgG1,而6株单抗的轻链类型均为κ,具体见表4:

[0079] 表4单克隆抗体亚型鉴定

[0080]

单克隆抗体	重链亚型	轻链亚型
S3G1	IgG1	kappa (κ)
S3G5	IgG1	kappa (κ)
S5F4	IgG1	kappa (κ)
S7B3	IgG2a	kappa (κ)
S13A8	IgG1	kappa (κ)
S14A7	IgG1	kappa (κ)

[0081] (5) 选择8~10周龄的雌性BALB/c小鼠,经腹腔注射弗氏不完全佐剂,500μL/只,一周后腹腔注射杂交瘤细胞,5×10⁵ cells/只。7~10d后收集腹水,采用辛酸-饱和硫酸铵法对获得的腹水进行纯化,最终得到6株纯化的单克隆抗体。采用PEDV S1-ELISA对其效价进行测定,结果6株单克隆抗体的效价在100×2⁸~100×2¹¹之间,BCA蛋白定量试剂盒检测显示其浓度在1.60~6.65mg/mL之间 (表5)。将各单克隆抗体分装后保存于-80℃。

[0082] 表5单克隆抗体浓度及效价测定

[0083]

单克隆抗体	抗体浓度 (mg/mL)	抗体效价
S3G1	6.65	100×2 ¹¹

S3G5	2.52	100×2^{11}
S5F4	2.88	100×2^8
S7B3	2.10	100×2^9
S13A8	1.60	100×2^{11}
S14A7	2.55	100×2^{10}

[0084] 实施例3:猪流行性腹泻病毒抗体捕获ELISA检测方法的建立

[0085] 1. 包被抗体的确定

[0086] 将纯化的6株单克隆抗体分别以饱和浓度包被酶标板,再加入实施例1制备的PEDV S1蛋白,100 μ L/孔(浓度为2 μ g/mL),对PEDV阴性血清、阳性血清各5份进行检测,检测结果以P/N值表示。结果显示,以单克隆抗体S13A8作为包被抗体时,在5组的检测结果中除第4组外,P/N值均最大(表6),因此选择单克隆抗体S13A8作为抗体捕获ELISA的包被抗体。

[0087] 表6包被抗体的确定

[0088]

	血清		S3G1	S3G5	S5F4	S7B3	S13A8	S14A7
--	----	--	------	------	------	------	--------------	-------

[0089]

第 1 组	OD _{630nm} 值	+	1.195	1.155	1.189	1.249	1.612	0.845
		-	0.175	0.199	0.152	0.134	0.139	0.126
	P/N 值		6.829	5.804	7.822	9.321	11.597	6.706
第 2 组	OD _{630nm} 值	+	1.212	1.093	1.049	1.192	1.495	0.740
		-	0.205	0.158	0.149	0.192	0.164	0.136
	P/N 值		5.912	6.918	7.040	6.208	9.116	5.441
第 3 组	OD _{630nm} 值	+	1.344	1.382	1.386	1.289	1.653	0.873
		-	0.274	0.160	0.191	0.251	0.165	0.149
	P/N 值		4.905	8.638	7.257	5.135	10.018	5.859
第 4 组	OD _{630nm} 值	+	1.594	1.500	1.530	1.557	1.687	1.101
		-	0.339	0.152	0.180	0.316	0.202	0.146
	P/N 值		4.702	9.868	8.500	4.927	8.351	7.541
第 5 组	OD _{630nm} 值	+	0.934	0.512	0.592	0.679	1.116	0.361
		-	0.250	0.157	0.202	0.175	0.191	0.150
	P/N 值		3.736	3.261	2.931	3.880	5.843	2.407

[0090] 2. 包被抗体最佳包被浓度的确定

[0091] 将单克隆抗体S13A8用包被液以1:100稀释后再进行倍比稀释(1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800),将不同稀释度的单抗分别包被酶标板,100 μ L/孔,2~8 $^{\circ}$ C包被过夜;弃液后用PBST洗涤3次,加入含5%脱脂奶的PBST,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭1h;弃液后用PBST洗涤3次,加入HRP标记的羊抗鼠IgG(购自碧云天生物公司),37 $^{\circ}$ C孵育1h,加入底物进行显色,检测OD_{630nm}值。

[0092] 结果发现,当抗体稀释倍数小于1:800时,OD_{630nm}值无明显差异(图4),表明此时包被抗体已达到饱和,因此确定包被抗体的最佳稀释度为1:800,此时的抗体浓度为2 μ g/mL。

[0093] 3. S1蛋白孵育浓度及血清稀释度的确定

[0094] 将单克隆抗体S13A8以2 μ g/mL于2~8 $^{\circ}$ C包被酶标板过夜,弃液后用PBST洗涤3次;加入含0.5%BSA的PBST,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭1h,弃液后用PBST洗涤3次;对PEDV S1蛋白和PEDV阴性、阳性血清分别进行梯度稀释,通过棋盘法确定S1蛋白浓度为2 μ g/mL、血清稀释倍数为1:40时,P/N值最大(表7),因此确定S1蛋白的孵育浓度为2 μ g/mL、血清稀释倍数为1:40。

[0095] 表7S1蛋白孵育浓度及血清稀释度的确定

蛋白浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	血清		血清稀释倍数					
			1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
4	OD _{630nm} 值	+	3.34	3.315	3.026	1.951	0.944	0.499
		-	1.254	0.638	0.332	0.193	0.134	0.113
	P/N 值		2.663	5.196	9.114	10.109	7.045	4.416
3.5	OD _{630nm} 值	+	3.285	3.245	2.644	1.406	0.73	0.406
		-	0.981	0.482	0.265	0.171	0.127	0.106
	P/N 值		3.349	6.732	9.977	8.222	5.748	3.830
3	OD _{630nm} 值	+	3.267	3.23	2.432	1.421	0.678	0.415

[0097]		-	1.04	0.525	0.284	0.18	0.138	0.115
		P/N 值	3.141	6.152	8.563	7.894	4.913	3.609
	2.5	OD _{630nm} 值	+	3.269	3.178	2.332	1.168	0.585
			-	0.955	0.439	0.253	0.15	0.124
		P/N 值	3.423	7.239	9.217	7.787	4.718	3.515
	2	OD _{630nm} 值	+	3.256	3.175	2.586	1.351	0.699
			-	0.849	0.473	0.244	0.164	0.123
		P/N 值	3.835	6.712	10.598	8.238	5.683	3.960
	1.5	OD _{630nm} 值	+	3.235	2.865	1.862	0.962	0.508
			-	0.866	0.423	0.233	0.154	0.118
		P/N 值	3.736	6.773	7.991	6.247	4.305	3.010
	1	OD _{630nm} 值	+	3.182	2.722	1.69	0.855	0.447
			-	0.848	0.433	0.246	0.152	0.117
		P/N 值	3.752	6.286	6.870	5.625	3.821	1.758
	0.5	OD _{630nm} 值	+	1.553	0.921	0.596	0.396	0.262
			-	0.725	0.425	0.258	0.174	0.132
		P/N 值	2.142	2.167	2.310	2.276	1.985	1.875

[0098] 表7中※“+”表示阳性血清,“-”表示阴性血清。

[0099] 4. 封闭液的确定

[0100] 将单克隆抗体S13A8以 $2\mu\text{g/mL}$ 于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 包被酶标板过夜,弃液后用PBST洗涤3次,每次5min;PBST作为“不封闭组”设为对照,对8种常用ELISA封闭液(含0.5%BSA的PBST、含1%BSA的PBST、含2%BSA的PBST、含4%BSA的PBST、含1%海藻糖的PBST、含2%海藻糖的PBST、含5%脱脂奶的PBST、含10%脱脂奶的PBST)进行了比较检测,检测时每份血清样品设置2个重复,根据检测结果计算OD_{630nm} 平均值,结果显示不封闭时P/N值最大(表8),因此确定本检测方法无需封闭。

[0101] 表8封闭液的确定

封闭液	OD _{630nm} 平均值		P/N 值
	阳性血清	阴性血清	
含 0.5%BSA 的 PBST	1.319	0.131	10.103
含 1%BSA 的 PBST	1.551	0.180	8.641
含 2%BSA 的 PBST	1.330	0.210	6.348
含 4%BSA 的 PBST	1.320	0.230	5.752
含 1%海藻糖的 PBST	1.472	0.128	11.500
含 2%海藻糖的 PBST	1.721	0.156	11.029
含 5%脱脂奶的 PBST	1.034	0.728	1.420
含 10%脱脂奶的 PBST	1.051	0.987	1.065
PBST	1.933	0.134	14.476

[0103] 5. 血清稀释液的确定

[0104] 对几种不同的血清稀释液(含5%BSA的PBS、含1%BSA的PBS、含0.5%BSA的PBS、PBS、含5%BSA的PBST、含1%BSA的PBST、含0.5%BSA的PBST、PBST)进行比较检测,检测时每份血清样品设置2个重复,根据检测结果计算OD_{630nm} 平均值,结果显示以含1%BSA的PBST作为血清稀释液时P/N值最大(表9),因此确定以含1%BSA的PBST作为本检测方法的血清稀释液。

[0105] 表9血清稀释液的确定

血清稀释液	OD _{630nm} 平均值		P/N 值
	阳性血清	阴性血清	
含 5%BSA 的 PBS	0.851	0.105	8.105
含 1%BSA 的 PBS	0.853	0.124	6.903
含 0.5%BSA 的 PBS	0.965	0.157	6.166
PBS	1.167	0.134	8.705
含 5%BSA 的 PBST	1.017	0.309	3.295
含 1%BSA 的 PBST	1.221	0.114	10.706
含 0.5%BSA 的 PBST	1.072	0.170	6.306
PBST	1.401	0.475	2.953

[0107] 6. 血清孵育时间的确定

[0108] 对6种不同的血清孵育时间:15min、30min、45min、60min、90min、120min进行了比较,检测时每份血清样品设置2个重复,根据检测结果计算OD_{630nm} 平均值,结果显示血清孵育45min时P/N值最大(表10),因此确定血清孵育时间为45min。

[0109] 表10血清孵育时间的确定

血清孵育时间	OD _{630nm} 平均值		P/N 值
	阳性血清	阴性血清	
120 min	1.863	0.222	8.409
90 min	1.673	0.189	8.875
60 min	1.165	0.164	7.125
45 min	1.180	0.124	9.555
30 min	0.758	0.111	6.829
15 min	0.486	0.107	4.563

[0111] 7. 酶标二抗孵育时间的确定

[0112] 对6种不同的酶标二抗孵育时间:15min、30min、45min、60min、90min、120min进行了比较,检测时每份血清样品设置2个重复,根据检测结果计算OD_{630nm} 平均值,结果显示酶标

二抗孵育60min时P/N值最大(表11),因此确定酶标二抗的孵育时间为60min。

[0113] 表11酶标二抗孵育时间的确定

	酶标二抗孵育时间	OD _{630nm} 平均值		P/N 值
		阳性血清	阴性血清	
[0114]	120 min	1.881	0.218	8.646
	90 min	1.706	0.225	7.582
	60 min	1.785	0.206	8.663
	45 min	1.442	0.218	6.615
[0115]	30 min	1.243	0.169	7.377
	15 min	0.769	0.167	4.605

[0116] 8.底物显色时间的确定

[0117] 对4种不同的底物显色时间:5min、10min、15min、20min进行了比较,检测时每份血清样品设置2个重复,根据检测结果计算OD_{630nm}平均值,结果显示底物显色时间为5min时P/N值最大(表12),因此确定底物显色时间为5min。

[0118] 表12底物显色时间的确定

	底物反应时间	OD _{630nm} 平均值		P/N 值
		阳性血清	阴性血清	
[0119]	5 min	1.461	0.137	10.661
	10 min	1.795	0.200	8.973
	15 min	2.226	0.212	10.498
	20 min	2.353	0.233	10.120

[0120] 9.阴阳性临界值的确定

[0121] 本发明中的抗体捕获ELISA方法以S/P值结果作为判定标准,通过对PEDV抗体阴性血清的检测,计算样品S/P值的平均值 $\bar{X}$ 和标准差SD来进行阴阳性的判定, $S/P值 = (待检样品OD_{630nm} - 阴性血清对照OD_{630nm}) / (阳性血清对照OD_{630nm} - 阴性血清对照OD_{630nm})$ 。当 $S/P值 \geq \bar{X} + 3SD$ 时判定为阳性,当 $S/P值 < \bar{X} + 2SD$ 时判定为阴性,当 $S/P值$ 介于 $\bar{X} + 2SD$ 与 $\bar{X} + 3SD$ 之间判定为可疑,需要重新检测,再次检测时 $S/P值 \geq \bar{X} + 2SD$ 时判定为阳性, $S/P值 < \bar{X} + 2SD$ 时判定为阴性。

[0122] 用本检测方法对201份PEDV抗体阴性血清进行检测,计算S/P值的平均值 $\bar{X} = -0.045$,标准差 $SD = 0.064$,由此确定当 $S/P值 \geq 0.147$ 时判定为阳性, $S/P值 < 0.083$ 时判定为阴性,当 $0.083 \leq S/P值 < 0.147$ 时判定为可疑,需要重新检测,再次检测 $S/P值 \geq 0.083$ 时判定为阳性, $S/P值 < 0.083$ 判定为阴性。

[0123] 10.抗体捕获ELISA检测方法操作程序

[0124] (1)酶标板的包被:将浓度为2 $\mu g/mL$ 的单克隆抗体S13A8加入酶标板中,100 μL /孔,于2~8 $^{\circ}C$ 包被过夜;

[0125] (2)蛋白孵育:甩弃酶标板中的液体,并在吸水纸上拍干,每孔加入250 μL PBST洗板3次,每次5min;将PEDV S1蛋白用PBS稀释至2 $\mu g/mL$,每孔加入100 μL ,37 $^{\circ}C$ 孵育90min;

[0126] (3)包被酶标板的密封与保存:甩弃酶标板中的液体,并在吸水纸上拍干,每孔加入250 μL PBST洗板3次,每次5min;在超净工作台吹干酶标板,用铝箔袋密闭封装,置于2~8 $^{\circ}C$ 保存;

[0127] (4) 样品的检测:取出预制酶标板,将待检血清用血清稀释液进行1:40稀释,并设立阴性、阳性血清对照及空白对照,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育45min;甩弃酶标板中的液体后在吸水纸上拍干,每孔加入250 μ L PBST洗板3次,每次5min;每孔加入100 μ L HRP标记的兔抗猪IgG,37 $^{\circ}$ C孵育1h;甩弃酶标板中的液体后在吸水纸上拍干,每孔加入250 μ L PBST洗板3次,每次5min;依次加入50 μ L底物液A和50 μ L底物液B,避光反应5min后加入50 μ L终止液,在酶标仪中读取OD_{630nm}值,按照确定的计算方法将OD_{630nm}值换算为S/P值并判定检测结果。

[0128] 11. 特异性试验

[0129] 用建立的抗体捕获ELISA方法对猪群中其他几种常见病原(PDCoV、TGEV、PRRSV、PCV2、PRV、PoRV)的抗体阳性血清进行检测,结果均为阴性(表13),说明本检测方法具有良好的特异性。

[0130] 表13特异性试验

血清	PEDV (+)	PEDV (-)	PDCoV (+)	TGEV (+)	PRRSV (+)	PCV2 (+)	PRV (+)	PoRV (+)
[0131] OD _{630nm} 值	1.217	0.154	0.15	0.153	0.153	0.15	0.152	0.161
S/P 值	1	0	-0.004	-0.001	-0.001	-0.004	-0.002	0.007
结果判断	+	-	-	-	-	-	-	-

[0132] 12. 重复性试验

[0133] 用同一批次的预制酶标板检测14份临床血清,每份血清设置3个重复,测定OD_{630nm}值并计算变异系数,结果显示变异系数均小于10%(表14),表明批内检测重复性良好。

[0134] 表14批内重复性试验

样品	OD _{630nm} 值				标准差	变异系数
	重复 1	重复 2	重复 3	平均值		
阳性对照	1.332	1.177	1.206	1.238	0.067	5.43%
阴性对照	0.135	0.129	0.115	0.126	0.008	6.63%
[0135] 样品 1	3.221	3.2	3.193	3.205	0.012	0.37%
样品 2	3.274	3.258	3.253	3.262	0.009	0.27%
样品 3	3.244	3.252	3.218	3.238	0.015	0.45%
样品 4	3.237	3.227	3.202	3.222	0.015	0.46%
样品 5	3.206	3.199	3.186	3.197	0.008	0.26%
样品 6	3.233	3.228	3.217	3.226	0.007	0.21%
样品 7	2.782	2.75	2.751	2.761	0.015	0.54%
[0136] 样品 8	2.691	2.731	2.777	2.733	0.035	1.29%
样品 9	2.976	2.964	2.984	2.975	0.008	0.28%
样品 10	0.081	0.084	0.084	0.083	0.001	1.70%
样品 11	0.076	0.076	0.078	0.077	0.001	1.23%
样品 12	0.082	0.084	0.083	0.083	0.001	0.98%
样品 13	0.081	0.08	0.095	0.085	0.007	8.02%
样品 14	0.101	0.1	0.105	0.102	0.002	2.12%

[0137] 用三个批次的预制酶标板分别检测14份临床血清,测定OD_{630nm}值并计算变异系数,结果显示变异系数均小于10%(表15),表明批间检测重复性良好。

[0138] 表15批间重复性试验

样品	OD _{630nm} 值				标准差	变异系数
	重复 1	重复 2	重复 3	平均值		
阳性对照	1.142	1.21	1.178	1.177	0.028	2.36%
阴性对照	0.149	0.143	0.138	0.143	0.004	3.14%
样品 1	3.198	3.136	3.138	3.157	0.029	0.91%
样品 2	3.219	3.226	3.221	3.222	0.003	0.09%
样品 3	3.206	3.246	3.202	3.218	0.020	0.62%
样品 4	3.193	3.166	3.161	3.173	0.014	0.44%
样品 5	3.222	3.221	3.192	3.212	0.014	0.43%
样品 6	3.195	3.209	3.195	3.200	0.007	0.21%
样品 7	2.701	2.823	2.753	2.759	0.050	1.81%
样品 8	2.674	2.612	2.665	2.650	0.027	1.03%
样品 9	2.856	2.89	2.868	2.871	0.014	0.49%
样品 10	0.108	0.116	0.112	0.112	0.003	2.92%
样品 11	0.104	0.098	0.113	0.105	0.006	5.87%
样品 12	0.099	0.097	0.1	0.099	0.001	1.26%
样品 13	0.098	0.099	0.107	0.101	0.004	3.97%
样品 14	0.12	0.115	0.13	0.122	0.006	5.13%

[0139] 13. 抗体捕获ELISA检测方法与中和试验的比较

[0141] 用建立的抗体捕获ELISA方法与中和试验同时对255份临床血清样品进行检测,中和抗体效价通过Reed-Muench法计算,当中和抗体效价小于1:4时判定为中和抗体阴性,大于等于1:4时判定为中和抗体阳性。结果显示本检测方法和中和试验的阳性符合率为94.48%,阴性符合率为88.18%,总符合率为91.76%(表16)。说明本检测方法与血清中和试验具有较高的符合率,适用于临床样品的大规模检测。

[0142] 表16ELISA检测结果与血清中和试验的符合率

中和效价	血清数量 (255 份)	ELISA 结果		符合率
		阳性(150 份)	阴性(105 份)	
<1:4	110	13	97	88.18%
1:4~1:8	29	23	6	79.31%
1:8~1:16	24	22	2	91.67%
1:16~1:32	32	32	0	100%
>1:32	60	60	0	100%
阳性符合率 94.48%		阴性符合率 88.18 %		总符合率 91.76%

[0143] 实施例4:猪流行性腹泻病毒抗体捕获ELISA检测试剂盒的组装和应用

[0144] 1. 试剂盒各组份的制备与组成

[0145] (1) 试剂盒各组份的制备

[0146] ①预制酶标板:将单克隆抗体S13A8包被酶标板,加入PEDV S1蛋白进行孵育,风干后密封封装,置于2~8℃保存;

[0147] ②20×浓缩洗涤液:160gNaCl,4g KCl,71.6g Na₂HPO₄·12H₂O,5.4g KH₂PO₄,10mL Tween-20,0.2g硫柳汞钠,加去离子水溶解并定容至1L,分装,100mL/瓶;

[0148] ③血清稀释液:10gBSA,8gNaCl,0.2g KCl,3.58g Na₂HPO₄·12H₂O,0.27g KH₂PO₄,0.5mL Tween-20,0.2g硫柳汞钠,加去离子水溶解并定容至1L,分装,100mL/瓶;

[0151] ④辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗猪 IgG: 将商品化的 HRP 标记的兔抗猪 IgG (购自北京博奥森生物技术有限公司) 用含 0.05% Tween-20 的 0.01mol、pH 7.4 的 PBS 稀释 10000 倍, 经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装, 70mL/瓶;

[0152] ⑥底物液 A: 14.6g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 9.33g 柠檬酸, 0.52g 过氧化氢脲, 加去离子水溶解并定容至 1L, 调 pH 至 5.0 ~ 5.4, 用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装, 50mL/瓶;

[0153] ⑦底物液 B: 20mg 四甲基联苯二胺, 10mL 无水乙醇, 加去离子水溶解并定容至 1L, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装, 50mL/瓶;

[0154] ⑧终止液: 2.5mL 氢氟酸加到 900mL 去离子水中, 定容至 1L, 用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装, 50mL/瓶;

[0155] ⑨阴性血清对照: 3mL/瓶;

[0156] ⑩阳性血清对照: 3mL/瓶。

[0157] (2) 试剂盒组装

[0158] 按照表 17 所示组分组装试剂盒。

[0159] 表 17 猪流行性腹泻病毒抗体捕获 ELISA 检测试剂盒的组成

[0160]	组分	规格	数量
	预制酶标板	96 孔/块	5 块
	阳性血清对照	3 mL	1 瓶
	阴性血清对照	3 mL	1 瓶
	血清稀释液	100 mL	1 瓶
[0161]	20X 浓缩洗涤液	100 mL	1 瓶
	酶标抗体	70 mL	1 瓶
	底物液 A	50 mL	1 瓶
	底物液 B	50 mL	1 瓶
	终止液	50 mL	1 瓶
	使用说明书	份	1 份

[0162] 2. 试剂盒应用

[0163] (1) 取出试剂盒, 室温下放置 30min; 将 20 $\times$ 浓缩洗涤液用去离子水按所需量稀释成 1 $\times$ 洗涤液备用; 回温的同时将待检血清样品用试剂盒里的血清稀释液进行 1:40 稀释。

[0164] (2) 取出所需数量的预制酶标板条, 每次检测设空白对照孔 1 孔, 阴性、阳性血清对照孔各 2 孔; 空白对照孔内加血清稀释液 100 μ L, 阴性、阳性血清对照孔分别加入阴性、阳性血清对照 100 μ L, 样品孔每孔加入稀释后的样品 100 μ L。

[0165] (2) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45min; 甩弃酶标板中的液体后在吸水纸上拍干, 每孔加入 250 μ L 洗涤液洗板 3 次, 每次 5min。

[0166] (3) 每孔加入 100 μ L HRP 标记的兔抗猪 IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h; 甩弃酶标板中的液体后在吸水纸上拍干, 每孔加入 250 μ L 洗涤液洗板 3 次, 每次 5min。

[0167] (4) 每孔依次加入 50 μ L 底物液 A 和 50 μ L 底物液 B, 避光反应 5min 后加入 50 μ L 终止液。

[0168] (5) 在酶标仪中读取 $\text{OD}_{630\text{nm}}$ 值, 计算 S/P 值, $\text{S/P 值} = (\text{待检样品 } \text{OD}_{630\text{nm}} - \text{阴性血清对照 } \text{OD}_{630\text{nm}}) / (\text{阳性血清对照 } \text{OD}_{630\text{nm}} - \text{阴性血清对照 } \text{OD}_{630\text{nm}})$ 。

[0169] (6) 结果判定: 参考值: 空白对照 $\text{OD}_{630\text{nm}}$ 值应 < 0.05 , 阴性对照孔的 $\text{OD}_{630\text{nm}}$ 值 ≤ 0.3 , 阳性对照孔 $\text{OD}_{630\text{nm}}$ 值应 ≥ 0.5 。根据样品 S/P 值对其进行阴阳性判定, 当 S/P 值 ≥ 0.147 时判定

为阳性,当S/P值<0.083时判定为阴性,当 $0.083 \leq S/P$ 值<0.147时判定为可疑,需要重新检测,再次检测时S/P值 ≥ 0.083 时判定为阳性,S/P值<0.083时判定为阴性。

[0170] 实施例5:单克隆抗体S13A8可变区序列的扩增与分析

[0171] 按Trizol试剂(购自Omega公司)说明书提取杂交瘤细胞株S13A8的总RNA,依照Roche反转录试剂盒将RNA反转成cDNA作为模板,设计12对扩增重链可变区的简并引物和11对扩增轻链可变区的简并引物通过PCR扩增可变区基因,简并引物序列见表18和表19。

[0172] 表18扩增重链可变区的简并引物

上下游引物	引物名称	引物序列 (5'~3')
[0173] F	MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC
	MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT
	MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT
	MHV4	ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRITT
	MHV5	ATGGGACTCCAGGCTTCAATTTAGTTTTCCCTT
	MHV6	ATGGCTTGTCYTTRGSGCTRCTCTTCTGC
	MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRGTCTTMTCTT
	MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG
	MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTTATTCCTG
	MHV10	ATGGGCAGACTTACCATTCTCATTCTG
	MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
	MHV12	ATGATGGTGTTAAGTCCTTCTGTACC
R	MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG

[0174] 表19扩增轻链可变区的简并引物

上下游引物	引物名称	引物序列 (5'~3')
[0175] F	MKV1	ATGAAGATTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
	MKV2	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTAYGGGTG
	MKV3	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGS GTTG
	MKV4	ATGAGGRCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWCTTG
	MKV5	ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC
	MKV6	ATGAGGTKCYTGYTSAYCTYCTCTGRGG
	MKV7	ATGGGCWTCAAAGATGGAGTCACAKWYYCWGG
	MKV8	ATGTGGGGAYCTKTTTYCMMTTTTTCAATG
	MKV9	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
	MKV10	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTCT
	MKV11	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
R	MKC	ACTGGATGGTGGGAAGATGG

[0176] 结果显示,有1对扩增重链可变区的简并引物(MHV12,MHCG1)和2对扩增轻链可变区的简并引物(MKV2,MKC;MKV4,MKC)可扩增出目的条带。将获得的目的片段连接到T载体后测序,将测序结果与抗体基因库(IMG)进行比对分析后获得1种抗体重链可变区序列和1种抗体轻链可变区序列(其中引物MKV2,MKC扩增的基因序列属于含终止密码子的无效重排基因)。

[0177] 其中,单克隆抗体S13A8的重链可变区序列大小为318bp,核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。该重链可变区具有完整的抗体可变区结构,第22位和95位是特征性氨基酸——半胱氨酸,与Musmus IGHV3-8*02F同源性达96.49%。重链可变区中包括氨基酸序列为GDSITSGY的CDR1、氨基酸序列为ISFSGST的CDR2和氨基酸序列为ARPDYDGYFAY的CDR3。

[0178] 单克隆抗体S13A8的轻链可变区序列大小为291bp,核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。该轻链可变区具有完整的抗体可变区结构,第23位和88位是特征性氨基酸——半胱氨酸,与Musmus IGKV9-124*01F的同源性达98.21%。轻链可变区中包括氨基酸序列为QEISGY的CDR1、氨基酸序列为AAS的CDR2和氨基酸序列为LQYASYPLT的CDR3。

[0179] 以上所述之实施例,只是本发明的较佳实施例而已,并非限制本发明的实施范围,故凡依本发明专利范围所述的构造、特征及原理所做的等效变化或修饰,均应包括于本发明申请专利范围内。

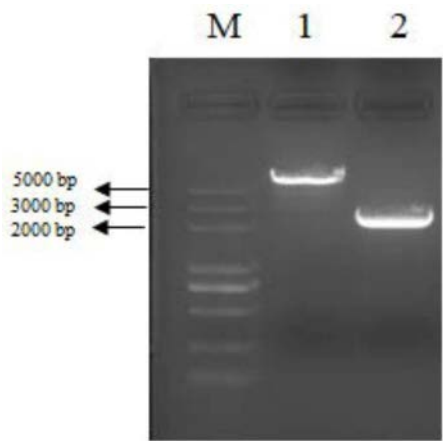


图1

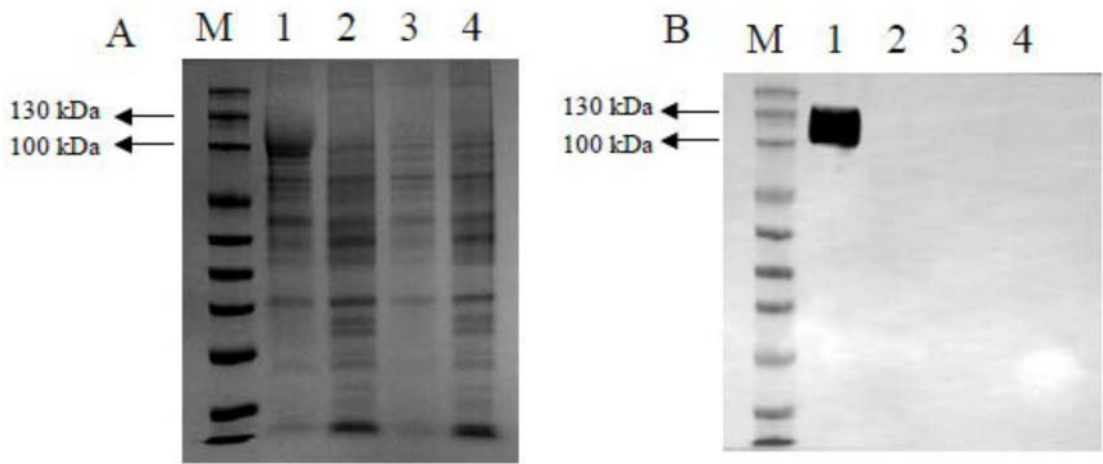


图2

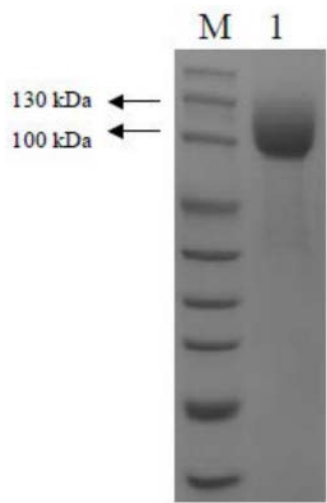


图3

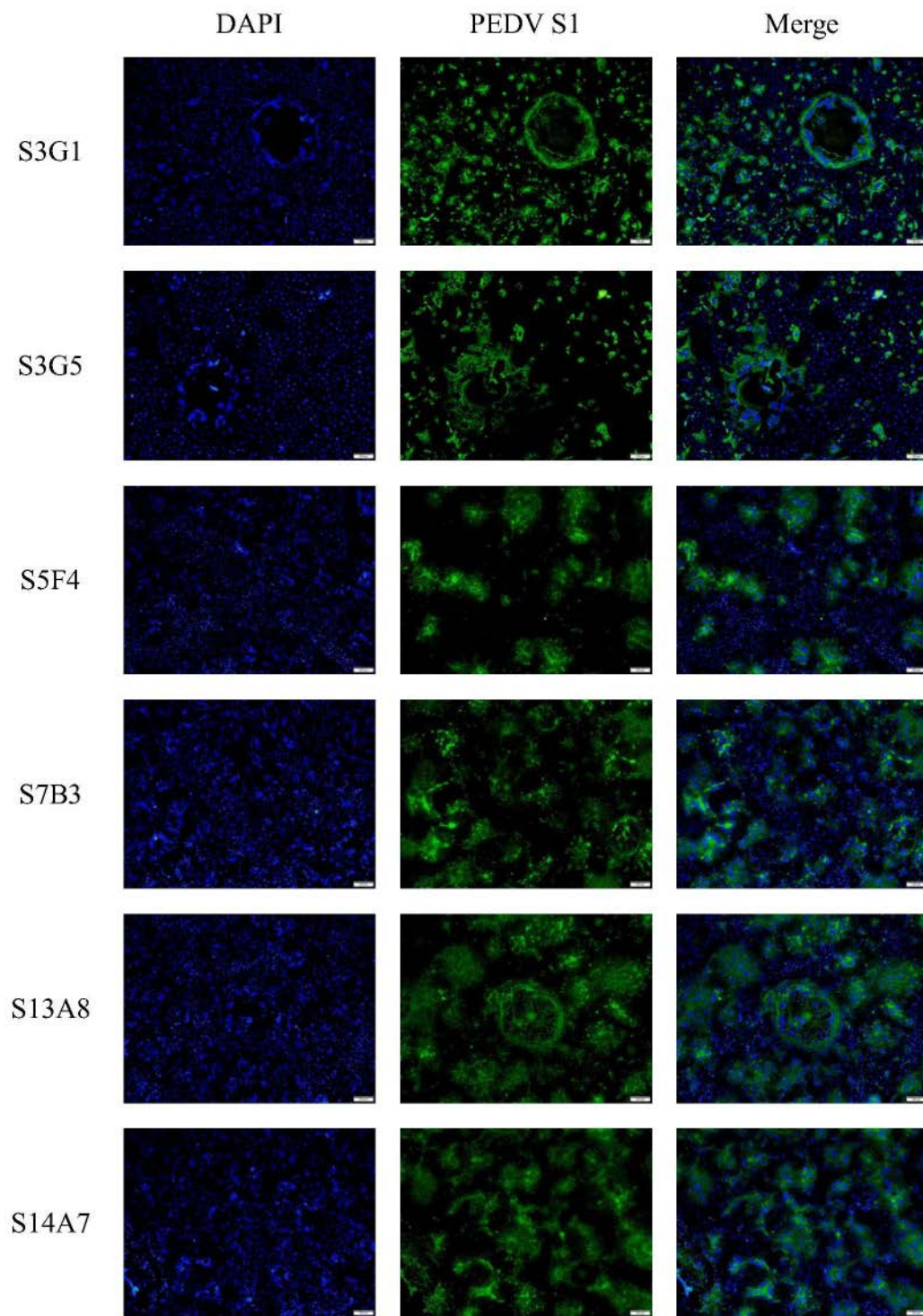


图6