



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103525767 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201310433433. 1

C07K 16/10(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 09. 22

G01N 33/577(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

G01N 33/569(2006. 01)

CCTCC NO: C201360 2013. 06. 06

C07K 14/145(2006. 01)

(71) 申请人 深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心

地址 518045 广东省深圳市福强路 1011 号

申请人 深圳市三方圆生物科技有限公司

(72) 发明人 贾鹏 钟松清 何俊强 刘蕊
郑晓聪 谭攀 王津津 史秀杰
兰文升 于力 谢冬霞

(74) 专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司 44281

代理人 彭家恩 彭愿洁

(51) Int. Cl.

C12N 5/20(2006. 01)

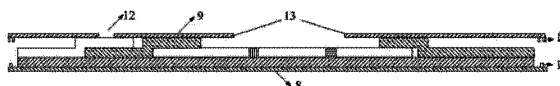
权利要求书1页 说明书10页
序列表4页 附图2页

(54) 发明名称

抗 IHNV 单克隆抗体 6G7 及其制备与应用

(57) 摘要

本申请公开了一种抗传染性造血组织坏死病毒(IHNV)单克隆抗体 6G7, 及其制备和应用。该单克隆抗体 6G7 由杂交瘤细胞株 IHNV-6G7 分泌, 该细胞株的保藏号为 CCTCC C201360。该杂交瘤细胞株 IHNV-6G7 能稳定产生单克隆抗体 6G7, 该抗体具有抗体效价高、灵敏度高、特异性强、与天然抗原的亲合力强等优点。本申请还提供了一种包含该单克隆抗体的快速检测试纸条及其试剂盒, 其采用荧光纳米微球免疫层析检测技术, 具有良好的灵敏度、特异性, 稳定性、重复性和再现性等特点。同时, 该试纸条和试剂盒使用简单方便、检测速度快、可满足食品安全、屠宰、检测机构等的检测要求, 适用于现场检测。



1. 保藏号为 CCTCC C201360 的杂交瘤细胞株 IHNV-6G7。
2. 一种抗传染性造血组织坏死病毒单克隆抗体,其特征在於:所述抗体由保藏号 CCTCC C201360 的杂交瘤细胞株 IHNV-6G7 产生。
3. 根据权利要求 1 所述的杂交瘤细胞株 IHNV-6G7 在制备传染性造血组织坏死病毒检测试剂或设备中的应用。
4. 如权利要求 2 所述的抗传染性造血组织坏死病毒单克隆抗体在制备传染性造血组织坏死病毒检测试剂或设备中的应用。
5. 一种传染性造血组织坏死病毒快速检测试纸条,其特征在於:所述试纸条包含权利要求 2 所述的抗传染性造血组织坏死病毒单克隆抗体。
6. 根据权利要求 5 所述的传染性造血组织坏死病毒快速检测试纸条,其特征在於:所述抗传染性造血组织坏死病毒单克隆抗体包附荧光纳米微球。
7. 根据权利要求 5 或 6 所述的快速检测试纸条在传染性造血组织坏死病毒检测中的应用。
8. 一种传染性造血组织坏死病毒检测试剂盒,其特征在於:该试剂盒包括如权利要求 5 或 6 中所述的传染性造血组织坏死病毒快速检测试纸条。
9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒在传染性造血组织坏死病毒检测中的应用。
10. 一种用于制备权利要求 1 所述杂交瘤细胞株 IHNV-6G7 的蛋白,其特征在於,所述蛋白的氨基酸序列包含 SEQ ID NO. 2 所示序列。

抗 IHN 单克隆抗体 6G7 及其制备与应用

技术领域

[0001] 本申请涉及传染性造血组织坏死病毒检测领域,特别涉及一种抗传染性造血组织坏死病毒(IHN)单克隆抗体 6G7 及其制备与应用。

背景技术

[0002] 鱼传染性造血器官坏死病(或称传染性造血器官坏死病, infectious haematopoietic necrosis of fish, IHN)是由一种毒力很强的弹状病毒,即传染性造血器官坏死病毒血症病毒(Infectious hematopoietic necrosis virus, 简称 IHN)所引起的急性、全身性的严重传染病,致病因子 IHN 病毒粒子呈弹状,有囊膜,其内表面为基质蛋白(M),囊膜上有糖蛋白(G)突起膜内有基质蛋白、核蛋白、聚合酶等,侵染的主要靶器官是肾造血组织。这种爆发性疾病最早流行于北美太平洋西北养殖场的鲑科鱼类稚幼鱼,后来在日本、欧洲和朝鲜也曾检测到。1988年在中国东北地区各养鳟场陆续发现该病毒,最近在深圳和北京 2 个水产养殖场牙鲆、虹鳟及从美国进口的匙吻鲟卵中也检测到 IHN 的存在。

[0003] IHN 主要感染鲑、鳟鱼,敏感寄主通常为稚幼鱼,一般认为成鱼比稚幼鱼难以感染,成鱼一般不表现临床症状,成为病毒的终身携带者,在苗种期感染 IHN 后残留的带病毒鱼是主要传染源,病毒可随着粪、尿、性腺产物排入水中。病毒放到水中或拌在饲料中投喂均可引起发病。感染 IHN 的病鱼典型体表症状为厌食嗜睡、异常游动、眼突出、体色发黑、腹部积水,鳍条基部和肛门周围充血,肛门外有白色不透明粪便,有些感染该病毒后存活的鱼脊柱变形。解剖病鱼可见肝脏、脾脏、肾脏、肠道等充血,并有卡他性炎症,体腔内有积水,鳃及内脏颜色变淡;口腔、骨骼肌、脂肪组织、腹膜、脑膜、鳃和心包膜常有出血斑点,肠出血,鱼苗的卵黄囊也会出血、因充满浆液而膨大,肠道内常常没有食物。显微镜检结果表明,肾脏、造血组织、胰脏、肠道和肾上腺皮质出现退化和坏死;胃、肠固有膜的颗粒细胞、部分胰腺及胰岛细胞也会发生变性和坏死。

[0004] IHN 被国际兽疫局列为必须申报的疾病,是鱼类口岸第 I 类检疫对象,被我国列为二类动物疫病。

[0005] 防止 IHN 的传播是控制 IHN 发生的重要环节,而加强检疫是防止 IHN 传播的关键,因此应用灵敏、有效、快速的病毒检测技术非常重要。目前, IHN 的检测技术主要有细胞培养、免疫学技术、核酸杂交技术、核酸扩增技术(RT-PCR、Real-time RT-PCR、等温扩增技术)等。采用核酸检测技术,如专利 CN1687447(2005),公开了用 RT-PCR 法同步检测三种鱼病病毒的试剂盒及其检测方法;专利 CN102212620A(2011)公开了检测三种鱼类弹状病毒的测量审核用试剂盒,为用 PCR 方法检测此三种病毒的准确性提供了测评基准。然而,以上检查方法均需要一定的条件和技术,或因为需要特殊仪器,或因为费用昂贵等,其现场检测推广及多次重复追踪复查受到限制。此外,采用免疫学技术检测,如专利 US20050163795A1 和“朱旭等,传染性造血器官坏死病毒糖蛋白抗血清的制备及应用,《渔业科学进展》,201206(33)”采用 IHN-G 蛋白(表达蛋白)作为抗原,制备抗体,检测 IHN,却仍存在不能确保 IHN-G 蛋白有很好的抗原性,或抗原活性蛋白含量低、抗体特异性差的缺

点。

[0006] 荧光微球 (fluorescent microspheres, FMs) 是指将荧光染料通过物理和化学等方法吸附或包埋到粒子内而形成的直径在纳米至微米级 0.01-10um 范围内受激发光源激发能发出荧光的固体微粒。相比胶体金等传统标记物须大量聚集才会被辨别出,它的发光强度可以随激发光的强度增强而增强,所以荧光微球标记有望提高免疫层析技术的检测限。在微球壳结构的作用下,荧光微球具有相对稳定的形态结构、粒度均一、单分散性好、稳定性好、发光效率高重复性好、有较好的生物相容性。形成微球后染料荧光猝灭大大减少,发射强而稳定且基本不受外界环境介质变化的影响,因此荧光微球作为标记物的免疫层析技术有较高的研究价值与前景,并且操作简单快捷、结果清晰易于判断、无需复杂的实验技能和特殊设备,特别适于现场检测。因此,研究开发适合于快速检测用的抗 IHNV 单克隆抗体具有重要意义。

发明内容

[0007] 本申请的一个目的是提供一种适用于快速检测的抗传染性造血组织坏死病毒 (IHNV) 单克隆抗体。

[0008] 本申请的另一个目的是提供该单克隆抗体在传染性造血组织坏死病毒检测中的应用,特别的提供了一种特异性高、灵敏度高的传染性造血组织坏死病毒 (IHNV) 快速检测试纸条及其试剂盒。

[0009] 为了实现上述目的,本申请采用了以下技术方案:

[0010] 本申请公开了一种可产生抗传染性造血组织坏死病毒 (IHNV) 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 IHNV-6G7,该细胞株已于 2013 年 6 月 6 日保藏在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC),保藏号为 CCTCC C201360。

[0011] 本申请公开了一种由上述保藏号 CCTCC C201360 的杂交瘤细胞株 IHNV-6G7 产生的抗 IHNV 单克隆抗体,在本申请中也将该抗体称为抗 IHNV 单克隆抗体 6G7 (或简称为单克隆抗体 6G7)。

[0012] 本申请同时公开了保藏号 CCTCC C201360 的杂交瘤细胞株 IHNV-6G7 在制备 IHNV 检测试剂或设备中的应用。

[0013] 本申请还公开了上述抗 IHNV 单克隆抗体 6G7 在制备 IHNV 检测试剂或设备中的应用

[0014] 本申请提供了一种 IHNV 快速检测试纸条,该试纸条包含上述抗 IHNV 单克隆抗体 6G7。

[0015] 进一步的,上述 IHNV 快速检测试纸条中,抗 IHNV 单克隆抗体 6G7 包附荧光纳米微球。

[0016] 本申请还提供了一种 IHNV 检测试剂盒,该试剂盒包括上述 IHNV 快速检测试纸条,例如可由上述 IHNV 快速检测试纸条组装而成。

[0017] 本申请还提供了上述 IHNV 快速检测试纸条或 IHNV 检测试剂盒在 IHNV 检测中的应用。

[0018] 此外,本申请还提供了一种用于制备上述保藏号为 CCTCC C201360 的杂交瘤细胞株 IHNV-6G7 的蛋白,该蛋白的氨基酸序列包含 SEQ ID NO. 2 所示的序列。

[0019] 由于采用了上述技术方案,本申请的有益效果在于:

[0020] 本申请提供的杂交瘤细胞株 IHNV-6G7 能稳定产生抗 IHNV 单克隆抗体 6G7,该抗体特异性强、亲和性好、灵敏度高,可应用于 IHNV 快速检测领域。

[0021] 同时,本申请提供了一种 IHNV 快速检测试纸条及其试剂盒,将荧光纳米微球检测技术应用到 IHNV 的检测领域。该试纸条具有特异性强、敏感性高、稳定性好、灵敏度高、可重复性和再现性等优点,同时,其还具备检测速度快、检测时间短、操作简单、结果稳定且直观等优势,能满足食品安全、屠宰、检测机构的检测要求,适用于现场检测。

附图说明

[0022] 图 1 为本申请具体实施方式中的一种传染性造血组织坏死病毒快速检测试纸条的结构示意图;

[0023] 图 2 为本申请具体实施方式中的一种传染性造血组织坏死病毒快速检测卡的结构示意图;

[0024] 图 3 为本申请具体实施方式中的实施例 1 中融合蛋白的原核表达定位分析结果图(12h);

[0025] 图 4 为本申请具体实施方式中的实施例 1 中融合蛋白的原核表达纯化分析结果图(12h)。

[0026] 保藏信息

[0027] 培养物名称:杂交瘤细胞株 IHNV-6G7。

[0028] 保藏日期:2013 年 6 月 6 日

[0029] 保藏单位:湖北省武汉市武昌珞珈山武汉大学保藏中心,即中国典型培养物保藏中心(CCTCC)

[0030] 保藏编号:CCTCC C C201360

具体实施方式

[0031] 本申请采用序列如 SEQ ID NO. 2 所示的蛋白 IHNV glycoprotein 作为免疫原,制备得到了杂交瘤细胞株 IHNV-6G7。该杂交瘤细胞株细胞染色体稳定,能稳定、高表达的分泌出具有高抗原亲和力、高特异性、效价高的抗 IHNV 单克隆抗体 6G7。具体的,该单抗可由上述杂交瘤细胞株通过注射 Balb/c 小鼠腹腔,诱生腹水,通过辛酸-硫酸铵纯化而大量获得。该抗 IHNV 单克隆抗体 6G7 具有较好的抗原性,与天然抗原的亲和力强,且特异性好、抗体效价高,可以作为 IHNV 多种检测方法中的重要试剂原料。该抗 IHNV 单克隆抗体 6G7 特别适用于 IHNV 快速检测领域,尤其适用于 IHNV 荧光纳米微球免疫层析检测法,具体的,基于本申请中得到的抗 IHNV 单克隆抗体 6G7 的高质量,其通过化学偶联方法可与荧光纳米微球的稳定结合,该抗体与荧光纳米微球偶联既不影响微球的光学性质,又不影响抗体的免疫学活性,因此可大大提高检测的灵敏度,提高检测限。

[0032] 由抗 IHNV 单克隆抗体 6G7 制备得到的 IHNV 荧光纳米微球快速检测试纸条,特异性强、敏感性高、稳定性好,同时具备可重复性和再现性等优点。该试纸条可进一步与其他部件构成 IHNV 检测试剂盒,例如将该试纸条与卡壳结合即可构成 IHNV 荧光纳米微球检测卡,其 IHNV 快速检测试纸条则是该试剂盒的核心。本申请采用荧光纳米微球免疫检测技

术,由于检测时荧光不受激发光本底的干扰,通过采用高质量的单克隆抗体 6G7 偶联荧光纳米微球,使得本申请中得到的试纸条、检测卡和试剂盒的灵敏度得到了大大的提高,从而提高了检测限。本申请中采用的荧光微球是核壳结构,克服了常规荧光微球的染料泄露、抗溶液干扰能力差等缺点,增加了荧光微球的稳定性和荧光的寿命。荧光微球表面修饰活性基团,采用化学偶联方法来标记抗体,形成抗体与微球的稳定结合。且该微球颗粒单分散性好,颗粒均一。具有较大的 Stokes 位移,在检测时激发光及发射光可以轻松地被分开,背景干扰较低。同时,本申请中的试纸条、检测卡和试剂盒具有操作简单,检测时间快,价格低廉的优点,适用于现场检测。

[0033] 本申请中的单克隆抗体 6G7 除了应用于上述荧光纳米微球免疫层析检测试纸条外,还可以用于其他 IHNV 检测试剂盒、试剂或设备中。本领域技术人员可以理解,将本申请所述的单克隆抗体 6G7 直接或间接结合其他信号基团(如胶体金、辣根过氧化物酶等),或将本申请所述的单克隆抗体 6G7 作为包被抗体(例如 ELISA),则可用于其他形式的 IHNV 检测试剂或设备。故本申请所制备得到的杂交瘤细胞及其分泌的抗体可广泛适用于制备 IHNV 检测试剂或设备。

[0034] 此外,本申请中采用的传染性造血组织坏死病毒 (Infectious hematopoietic necrosis virus, 简称 IHNV) 的毒株为 IHNV-UK,英国 CEFAS 赠送,由深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心保存,紫外分光光度仪 MK3 购自 Thermo Fisher scientific 公司。

[0035] 下面通过具体实施方式结合附图对本申请作进一步详细说明。

[0036] 实施例一:传染性造血组织坏死病毒膜蛋白的表达

[0037] 根据 NCBI 公布的登录号为 AAT99394 的序列,选取传染性组织坏死病毒膜蛋白 glycoprotein 为传染性组织坏死病毒抗原检测位点,利用抗原决定簇分析软件分析整个序列,最后选择免疫原性强、特异性高的一段蛋白作为免疫原,该蛋白的氨基酸序列为 SEQ ID NO. 2,合成蛋白对应的 DNA 序列为 SEQ ID NO. 1。将这段 DNA (序列如 SEQ ID NO. 1 所示)插入原核表达载体 PET28e 中,测序鉴定。用 IPTG 诱导表达,分离纯化出蛋白 IHNV glycoprotein,即可将其作为免疫原用于免疫小鼠制备抗体。具体表达纯化过程如下:

[0038] (1) 融合蛋白的原核表达

[0039] ①培养

[0040] 挑取单菌落于试管中(5mL LB 培养基,50ug/mL 氨苄青霉素)37°C,220rpm/min 过夜培养;

[0041] 将培养的菌液按 1:100 比例接种于 200ml LB 培养基中,添加 50ug/mL 氨苄青霉素,37°C,180rpm/min 扩大培养;

[0042] 当 OD 值达到 0.6 左右时,添加终浓度为 0.6mM 的 IPTG,37°C,120rpm/min 诱导 12h;

[0043] 收集菌体并用 PBS 缓冲液悬浮。

[0044] ②超声破碎菌体

[0045] 冰浴中超声破碎菌体,功率 200W,每 200mL 培养基进行 99 次循环(超声 3S,暂停 5S 为一个循环);

[0046] 超声完毕,8000rpm/min,4°C,离心 15min,收集上清和沉淀;

[0047] 将离心后沉淀采用溶解液(PBS,8M 尿素)悬浮,室温孵育 3h,然后 6000rpm/min,4℃,离心 15min,上清以备纯化。

[0048] ③镍琼脂糖亲和层析

[0049] 用 10 倍柱床体积的 Binding buffer 清洗平衡柱子,流速 60ml/h;

[0050] 样品(溶解液上清)上柱,流速为 45ml/h,收集穿透液;

[0051] 10 倍柱床体积的 Binding buffer 清洗柱子,流速 60ml/h;

[0052] Eulte Buffer 洗脱,流速 45ml/h,收集洗脱液;

[0053] 将纯化后的蛋白置于透析袋中,在 PBS 缓冲液(pH=8.0)中缓慢透析 12h,收集透析后的样品,SDS-PAGE 分析并保存备用。

[0054] 注:Binding Buffer (PBS,8M 尿素 15mM 咪唑,300mM NaCl,0.5%Triton X-100,pH=8.0) Eulte Buffer (PBS,8M 尿素,500mM 咪唑,pH=8.0)

[0055] (2) 融合蛋白的表达及定位

[0056] 通过对样品进行 SDS-PAGE 分析,电泳显示在相应位置(33kD)出现明显的新生条带,表明融合蛋白在诱导 12h 后成功得到了表达,见图 3。图 3 中,M 为蛋白 marker,1 所示为诱导前样品,2 所示为诱导后样品,3 所示为超声后上清,4 所示为超声后沉淀,其条件为浓缩胶 80V,15 分钟;分离胶 150V,60 分钟。

[0057] (3) 融合蛋白的纯化

[0058] 融合蛋白经过镍琼脂糖亲和层析法进行纯化,SDS-PAGE 电泳分析在相应位置(33kD)均出现明显条带,表明融合蛋白 12 小时后成功得到了纯化,见图 4。图 4 中,M 为蛋白 marker,1 所示为目的蛋白,其条件为浓缩胶 80V,15 分钟;分离胶 150V,60 分钟。

[0059] 实施例二:抗传染性组织坏死病毒单克隆抗体的制备:

[0060] (1) 共选取 8 周龄 BALB/C 小鼠 5 只,免疫程序如下:

[0061] 首免:以实施例 1 中得到的 IHNV glycoprotein 作为免疫原,以 Quick Antibody-Mouse5W 作为免疫佐剂,免疫剂量为 5 μ g/只(5 μ g 免疫原+5 μ L Quick Antibody-Mouse5W+生理盐水 90 μ l),大腿肌肉注射。

[0062] 加强免疫:于首免后第 21 天进行,免疫剂量为 5 μ g/只(5 μ g 免疫原+5 μ L Quick Antibody-Mouse5W+生理盐水 90 μ l),共免疫 2 次,第 35 天断尾采血分离血清,用间接 ELISA 法检测抗 IHMV 悬液的血清抗体效价。若效价达到 1:5000,即可用于细胞融合。

[0063] 选取 ELISA 法检测抗体较高的免疫小鼠,眶下窦采血,分离血清。脱颈致死小鼠;

[0064] 无菌手术取出脾脏制备脾细胞,并与 NS0 细胞在 50%PEG 作用下进行细胞融合;

[0065] 将融合后的细胞悬液加到 96 孔细胞培养板上,用 HAT 培养基进行选择培养。融合后的细胞置 37℃,5%CO₂ 培养箱中培养;

[0066] 用间接 ELISA 法以 0.5 μ g/孔的蛋白的量包被酶标板进行阳性筛选。P/N 大于 2.1 时即为阳性。对强阳性、细胞生长旺盛的孔进行 3 次有限稀释克隆化,得到保藏号为 CCTCC C201360 的杂交瘤细胞株 IHMV-6G7。

[0067] (2) 单抗的大量制备:

[0068] 本例采用腹水法大量制备抗 IHNV 单克隆抗体 6G7。将杂交瘤细胞株 IHNV-6G7 扩大培养,待细胞浓度达 5 \times 10⁵ 个/mL 时,收集培养液,测定其 ELISA 效价和抑制价;

[0069] 给腹腔注射 0.5ml 的降植烷,10 天后的小鼠腹腔注射克隆化细胞株 10⁷ 个细胞,7

天后抽取腹水,用 IHN 病毒悬液包被酶标板测其 ELISA 效价和抑制价。

[0070] (3) 单抗的纯化:

[0071] 采用辛酸—硫酸铵法进行单抗的纯化。将 20mL 腹水加入离心管中,于 4℃ 12000rpm×15min,将上清转移至另一容器中;向上清中加入 4 倍血清体积的 0.06M pH4.8 的醋酸缓冲液,室温边加边搅拌;

[0072] 向上述混合物中加入适量的辛酸(33 μL/mL),滴加时要缓慢,室温滴加,边滴加边搅拌;辛酸滴加完后,室温搅拌 30min;于 4℃ 离心,12000rpm×30min,取上清,用滤纸过滤;

[0073] 向滤液中加入 ≤ 45% 的饱和硫酸铵溶液(SAS),室温搅拌 30min,4℃ 静置 2h 或过夜;

[0074] 于 4℃ 离心 12000rpm×30min,弃上清,沉淀用适量 0.01mol/L PH7.4PBS 重悬,用 0.01mol/L PH7.4PBS 于 4℃ 透析 24h,其间换液 4 次;

[0075] 将透析物于 4℃ 离心 12000rpm×30min,收集上清分装于 EP 管中,用核酸蛋白测定仪测定蛋白含量,稀释至 10mg/mL,置于 -20℃ 保存。

[0076] (4) 单克隆抗体特异性检测:

[0077] 用纯化的抗 IHN 单克隆抗体 6G7 分别与其他鱼类病毒(锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲤春病毒血症病毒(SVCV)、病毒性出血性败血病毒(VHSV)、传染性胰脏坏死病毒(IPNV)、真鲷虹彩病毒(RSIV)、草鱼出血病病毒(GCHV)和流行性造血器官坏死病毒(EHN))包被的 ELISA 板反应,鉴定单克隆抗体的特异性。

[0078] 实施例三:荧光纳米微球的制备:

[0079] (1) 黄色荧光纳米晶——CdTe / CdS 核壳半导体纳米晶的制备

[0080] 在离心管中加入硼氢化钠,注入高纯水;待硼氢化钠溶解后迅速加入碲粉,其摩尔比为 2:1。反应体系用冰冷却,预留排气口排出反应中产生的氢气。反应 2~8 小时,瓶底生成白色的四硼酸钠沉淀,上层清液即为所需的 NaHTe 溶液。

[0081] 反应方程式为:

[0082] $4\text{NaBH}_4 + 2\text{Te} + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NaHTe} + \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 14\text{H}_2$;

[0083] 将 CdCl₂ 和巯基丙酸混合溶液的 pH 值调至 7~14,用微量进样器加入新制得的 NaHTe 溶液,其摩尔比为 Cd:Te:巯基丙酸=2:1:2~8。在氮气保护条件下将上述溶液在 50~110℃ 回流即得到黄色 CdTe 半导体纳米晶溶液。

[0084] (2) 黄色荧光纳米微球的制备

[0085] ① 聚苯乙烯微球(表面羧基 400nmol/mg)的制备

[0086] 将 2g PVP、7.6mL 去离子水和 60.4mL 无水乙醇加入到 250mL 三颈瓶中,搅拌形成均相体系后,通入 N₂1h 排净氧气;向瓶中缓慢滴加溶有 0.3g AIBN 的 30.0g 苯乙烯溶液。滴加完毕后,保持氮气气氛和一定搅拌速度,在 70℃ 下聚合反应 12h,即得乳液样品。将下层微球用无水乙醇反复洗涤后备用。

[0087] ② 黄色纳米晶在聚苯乙烯微球表面的组装

[0088] 将 1mL 带正电荷的聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)溶液加入到 1mL 表面带有负电荷的聚苯乙烯微球(PS)悬浊液中,20min 后将上层清液离心分离去除;用缓冲液对微球进行超声分散洗涤 3~5 次,每次超声完毕即将浊液离心分离去除上层清液;然后以相同方

法在微球表面再依次组装一层带负电的聚苯乙烯磺酸钠 (PSS) 和 PDDA, 最后在 PDDA 的表面通过静电作用力组装一层 CdTe 纳米晶, 这样, 微球表面即形成了 PDDA/PSS/PDDA/CdTe 层, 从而完成了黄色 CdTe 纳米晶的组装。重复以上“PDDA-PSS-PDDA-CdTe”操作, 就可以在 Ps 微球表面组装多层聚电解质 /CdTe 纳米晶复合层。

[0089] 实施例四: 荧光纳米微球检测卡的制备

[0090] (1) 固相硝酸纤维素 (NC) 膜的活化

[0091] 裁取 20mm×3-4mm 的 NC 膜, 于 0.1mol/L 的碳二亚胺溶液中浸泡, 15min 后取出, 室温风干 8min。抗 IHNV 多克隆抗体 (2mg/ml) 包被于固相硝酸纤维素膜的观察结果的测试反应区, 定义为检测线 (T), 包被正常羊抗鼠 IgG (2mg/ml) 于质控区, 定义为质控线 (C)。

[0092] 其中, 该抗 IHNV 多克隆抗体可通过以下方法制备得到:

[0093] 将实施例 1 中制备得到的 IHNV glycoprotein 作为免疫原, 以 Quick Antibody-Rabbit5W 作为免疫佐剂, 免疫剂量为 50 μg/只 (50 μg 免疫原 +50 μL Quick Antibody-Rabbit5W, 再用生理盐水补充至 100ul, 每针次 100ul, 小腿后腿肌肉注射免疫家兔, 首免后第 21 天用同样的方法进行加强免疫, 共免疫 2 次, 免疫后第 35 天耳静脉采血, 分离血清, 用表达蛋白包被的 ELISA 板检测抗体效价, 如果具有较高的抗体滴度, 通过颈动脉放血, 收集全血, 分离血清。用辛酸硫酸铵法提取 IgG, 用核酸蛋白测定仪测定蛋白含量, 将其稀释至 10mg/mL, 置于 -80℃ 保存备用。

[0094] 兔抗血清经饱和硫酸铵盐粗提, 透析, 再依次过 SephadexG25 和 DEAE 纤维素柱进一步提纯, 并将收集的蛋白质于透析袋中。置蔗糖或聚乙二醇中浓缩, 紫外分光光度计测其 280nm、260nm 波长处 OD 值, 以公式计算蛋白含量后 -20℃ 保存备用。

[0095] 经过 1 次初免, 1 次加强免疫后, 兔抗血清效价可达 1:50000 以上, 具有很高的抗血清效价。

[0096] 其中, 多克隆抗体动物种属来源应为非小鼠来源, 可为兔、山羊、绵羊、人、猪、马、牛, 制备多克隆的方法可以进行简单替换。

[0097] (2) 荧光纳米微球-抗体复合物的试的制备与纯化:

[0098] 10mL 标记体系的方法如下: 烧杯 (铬酸浸泡 72h, 再用蒸馏水洗涤并浸泡 24h, pH5.0 的 0.02M PB 缓冲液润洗 30min) 中加入 8mL 0.02M PB 缓冲液 (pH5.0, 下同), 加入荧光纳米微球 5mg, 快速搅拌下加入抗 IHNV 单克隆抗体 6G7 至终浓度为 0.4~0.8g/L, 再缓慢加入 10mg/mL EDC38.4uL, 再用 0.02M PB 缓冲液将体系体积补至 10mL。室温缓慢搅拌反应 2h, 再加入 1ml 10% (质量分数) BSA 封闭 30min; 8000r/min, 10℃ 离心 10min, 弃上清, 并以 PB 清洗, 相同条件离心, 重悬于 1ml PBS 缓冲液中, 4℃ 保存备用。

[0099] (3) 微球结合垫的制备

[0100] 裁取 20mm×4mm 的玻璃纤维, 分别取 50 μL 的荧光纳米微球抗体复合物用 BIODOT 喷点仪按 4uL/cm 喷涂在玻璃纤维膜上, 37℃ 干燥 1h。

[0101] (4) 检测卡的组装

[0102] 荧光纳米微球检测试纸条由样品垫、微球结合垫、硝酸纤维素膜及吸水纸 4 个部分组成, 在底板上依次搭接地粘帖吸水纸、样品垫、微球结合垫、含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜, 样品垫和微球结合垫用玻璃纤维, 底板为双面胶聚乙烯塑料板; 顺序装配, 裁成宽度为 4mm 的检测试纸条。

[0103] 本例中荧光纳米微球快速检测试纸条的结构示意图如图 1 所示,该荧光纳米微球快速检测试纸条,包括样品垫 1、微球结合垫 2、检测线(T) 3、固相硝酸纤维素膜 4、质控线(C) 5、吸水纸 6 以及底板 7。其中,底板 7 一端粘贴样品垫 1,另一端粘贴吸水纸 6,微球结合垫 2 是由荧光纳米微球标记的抗 IHNV 单克隆抗体复合物结合在玻璃纤维膜,其一端置于样品垫 1 下,另一端紧密连接固相硝酸纤维素膜 4;检测线(T) 3 为抗 IHNV 多克隆抗体;质控线(C) 5 为羊抗鼠 IgG 抗体;检测线(T) 3 和质控线(C) 5 位于固相硝酸纤维素膜底板 4 的中间;吸水纸 6 连接固相硝酸纤维素膜 4。

[0104] 进一步的,将上述 IHNV 荧光纳米微球快速检测试纸条组装成检测卡,该检测卡的结构如图 2 所示,将上述试纸条固定在底座 8 上,试纸条用外壳 9 压紧,底座 8 和外壳 9 通过卡齿 10 和卡孔 11 相连接;底座 8 上有与外壳 9 连接的卡齿 10 和与试纸条相匹配的凹槽,该试纸条位于所述凹槽内;外壳 9 上有加样孔 12、观察窗 13 和与底座卡齿 10 相配的卡孔 11,加样孔 12 的位置与试纸条样品垫的位置相对应,观察窗 13 与试纸条固相硝酸纤维素膜上的检测线(T) 和质控线(C) 相对应,具体的,观察窗上印有 T 和 C,分别与固相硝酸纤维素膜上的检测线(T) 和质控线(C) 相对应。

[0105] (5) 待测样品的前处理:

[0106] 当所述样品为鱼类组织时,病毒释放后,样品前处理方法为:

[0107] 1) 取样方式:表面健康的鱼:取肾、脾和脑;有临床症状的鱼:体长 ≤ 4 cm 取全鱼;体长在 4~6cm 之间,取包括肾脏和脑在内的所有脏器;体长 ≥ 6 cm,取肾、脾和脑;

[0108] 2) 取组织 6~7g,加入适量已灭菌石英砂,充分研磨,然后加入 50mL M199 培养基(含 10%FBS 和 100IU/mL 青霉素和 100 μ g/mL 双氢链霉素的双抗),转入 50ml 离心管,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。最后取孵育后的细胞悬液作为检测样品。

[0109] (6) 检测方法与判断标准

[0110] 将待检测样品滴加到检测卡的加样孔,水平放置,反应 5-10min。

[0111] 判断标准:在荧光读取仪中读取,若只在质控线 C 出现黄色,则表示为阴性;若在检测卡的质控线、检测线出现黄色,则判定为阳性。

[0112] 实施例五:荧光纳米微球快速检测卡的检测试验

[0113] (1) 样品中传染性造血组织坏死病毒的检测

[0114] 抗体标记在荧光纳米微球颗粒上,当加入样本后,荧光纳米微球标记抗体和样本一起向硝酸纤维素膜方向扩散,并最终渗入吸水纸端,扩散过程中待检的 IHNV 可与荧光纳米微球标记的抗 IHNV 单克隆抗体相结合。当样本中的 IHNV 超过检测限时,检测线(T) 显黄色,多余的荧光纳米微球标记的单克隆抗体与质控线(C) 的羊抗鼠 IgG 二抗相结合显色,C 线显黄色,形成 2 条黄色印记为阳性;反之,待测样品中无 IHNV 时,荧光纳米微球标记抗体在向硝酸纤维素膜方向扩散的过程中,不能与抗 IHNV 多克隆抗体相结合,不能形成固相多克隆抗体-抗原-荧光纳米微球标记抗体复合物,因此 T 线不显色,只能与羊抗鼠 IgG 二抗结合,C 线显黄色,记为阴性;如果硝酸纤维素膜没有显示黄色标记或 C 线不显色,则表明检测卡失效。

[0115] (2) 检测卡的敏感性试验:分别将已知病毒阳性细胞培养液 10 份经过倍比稀释,分别用检测卡进行检测,并且与病毒分离试验进行敏感性比较,结果表明检测卡的灵敏度为 50TCID₅₀, CV 值小于 15%。

[0116] (3) 检测卡的特异性试验之阻断试验:检测 IHNV 时显示为阳性,当将狗鱼弹状病毒(PFRV)、牙鲈弹状病毒(HRV)、传染性胰脏坏死病毒(IPNV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲤春病毒血症病毒(SVCV)、病毒性出血性败血病毒(VHSV)、真鲷虹彩病毒(RSIV)、草鱼出血病毒(GCHV)和流行性造血器官坏死病毒(EHNV)等几种病毒阳性细胞培养液分别加入检测卡的加样孔内,静置反应 10min 后,检测结果均为阴性,说明本检测卡特异性好,结果见表 1,其中“+”表示阳性,“-”表示阴性。

[0117] 表 1. 检测卡的特异性试验

[0118]

检测样品	IHNV	PFRV	HRV	PNV	KHV	SVCV	VHSV	RSIV	GCHV	EHNV
检测结果	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0119] (4) 检测卡的重复性试验:相同条件下,每天分别检测批内重复 20 份已知阳性样品和已知阴性样品,批间取 3 个不同的批次进行检测,持续检测 7 天,通过试纸显色的变化来确定检测卡的重复性,结果显示检测结果一致,说明该检测卡的重复性好。

[0120] (5) 微球检测卡的稳定性试验:主要通过破坏性试验(55℃)和实际情况下长期稳定性试验。55℃老化试验的原理根据阿仑尼乌斯公式: $d(\ln k)/dT = E_a/RT^2$, E_a 为表观活化能, R 为摩尔气体常量。变化趋势为 T 增大,一般 k 也增大, E_a 约等于 19.5Kcal/mol。计算出对应的温度与老化天数关系,55℃ 15 天相当于 25℃ 一年。全部数值以 25℃ 一年稳定性情况对比。将制备好的检测卡分为两组,一组置 55℃ 恒温温箱中,一组室温放置(25℃)同时进行对比实验,每间隔一定时间后取出部分进行检测,观察检测线和质控线有无、反应线的清晰度以及结合垫释放荧光纳米微球标记抗体的程度等。检测卡在 55℃ 下可稳定 15 天,换算为在室温下至少可稳定 12 个月,与 25℃ 一年稳定性情况一致。可见,该检测卡在室温保存 12 个月内具有良好的性能稳定性。

[0121] (6) 检测卡的验证试验:采用制备的检测卡分别对已知患有 IHN 的 20 份鱼样中肾、脾和脑,以及已知为阴性健康的 20 份鱼样的肾、脾和脑进行检测,并与 real time PCR 方法进行比较,结果见表 2 和表 3,试验结果表明,当为阳性样品时,检测阳性符合率为 100%,与 real time PCR 检测结果一致;当为阴性样品时,检测结果出现 1 份假阳性结果,阴性符合率为 99.1% 以上,结果与 real time PCR 检测结果相差不大,说明本申请的检测卡可以对 IHNV 进行快速检测。

[0122] 表 2. 阳性样本检测结果

[0123]

样本 \ 检测方法	阳性肾脏(20份)	阳性脾脏(20份)	阳性脑(20份)
试纸	20份阳性	20份阳性	20份阳性
real time PCR	20份阳性	20份阳性	20份阳性

[0124] 表 3. 阴性样本检测结果

[0125]

样本 检测方法	阴性肾脏(20份)	阴性脾脏(20份)	阴性脑(20份)
试纸	20份阴性	20份阴性	19份阴性
real time PCR	20份阴性	20份阴性	20份阴性

[0126] (7) 再现性试验:将同一批次的检测卡由不同的人员在同一实验室或不同实验室下操作,根据检测卡显色结果进行判断,结果表明,检测结果一致,检测卡具有再现性。

[0127] 以上内容是结合具体的实施方式对本申请所作的进一步详细说明,不能认定本申请的具体实施只局限于这些说明。对于本申请所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本申请构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换。

[0001]

序 列 表

- <110> 深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心, 深圳市三方圆生物科技有限公司
- <120> 抗 IHNV 单克隆抗体 6G7 及其制备与应用
- <130> DHC1310240
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 810
- <212> DNA
- <213> 传染性造血器官坏死病毒糖蛋白 glycoprotein [Infectious hematopoietic necrosis virus]
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (535)..(535)
- <223> n i s a, c, g, o r t
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (594)..(594)
- <223> n i s a, c, g, o r t
- <400> 1
- tcagaccaac ccacctggtc aaaccegetc tteacctace ccgagggatg cactctggac 60
- aaactctcca aggtcaatgc ctctcaactg agatgccc aa ggatcttoga tgatgagaat 120

[0002]

agggggctga ttgcctatcc cacatccatc cggtcctgt cggtcggaaa cgacctcggg	180
gatattcaca cccaaggga cfacatccac aaagtcctgt accgcacat etgetcaaca	240
gggtttttcg ggggtcagac gatagagaag gtgctttag aaatgaaact ctccacgaga	300
gaagcagggg catatgacac cacaaccgca gccgctctgt acttcccage ttcccgatgc	360
caatggtaca cggacaacgt acaaaatgat ctcatcttct actacacaac ccaaaagagt	420
gttttgagag atccctacac tagagacttt ctggactcag attttattgg aggaaagtgc	480
actaaatcac cctgccagac tcattggctc aacgtagttt ggatgggcca tgcanggata	540
ccaacttggtg atttcagcca agagataaaa ggteacctct ttggtgataa aatntccaat	600
cgagtcgtga aggcaacgag ctacgaacac cacccttggg gactgcatcg ggctgtatg	660
attgaattct gtggggggca gtggatacgg acagatctcg gtgacctgat atctgtcgta	720
tacaattctg gatcagtaac cctctcgttc ccgaagtgtg aggacaagac ggtggggatg	780
agggggaact tggatgactt tgccatctta	810

<210> 2

<211> 268

<212> PRT

<213> 传染性造血组织坏死病毒[Infectious hematopoietic necrosis virus]

<400> 2

Ser Asp Gln Pro Thr Trp Ser Asn Pro Leu Phe Thr Tyr Pro Glu Gly

1 5 10 15

Cys Thr Leu Asp Lys Leu Ser Lys Val Asn Ala Ser Gln Leu Arg Cys

[0003]

20	25	30
Pro Arg Ile Phe Asp Asp Glu Asn Arg Gly Leu Ile Ala Tyr Pro Thr 35	40	45
Ser Ile Arg Ser Leu Ser Val Gly Asn Asp Leu Gly Asp Ile His Thr 50	55	60
Gln Gly Asn Tyr Ile His Lys Val Leu Tyr Arg Thr Ile Cys Ser Thr 65	70	75 80
Gly Phe Phe Gly Gly Gln Thr Ile Glu Lys Val Leu Val Glu Met Lys 85	90	95
Leu Ser Thr Arg Glu Ala Gly Ala Tyr Asp Thr Thr Thr Ala Ala Ala 100	105	110
Leu Tyr Phe Pro Ala Ser Arg Cys Gln Trp Tyr Thr Asp Asn Val Gln 115	120	125
Asn Asp Leu Ile Phe Tyr Tyr Thr Thr Gln Lys Ser Val Leu Arg Asp 130	135	140
Pro Tyr Thr Arg Asp Phe Leu Asp Ser Asp Phe Ile Gly Gly Lys Cys 145	150	155 160
Thr Lys Ser Pro Cys Gln Thr His Trp Ser Asn Val Val Trp Met Gly 165	170	175

[0004]

Asp Ala Ile Pro Thr Cys Asp Phe Ser Gln Glu Ile Lys Gly His Leu
180 185 190

Phe Gly Asp Lys Ser Asn Arg Val Val Lys Ala Thr Ser Tyr Glu His
195 200 205

His Pro Trp Gly Leu His Arg Ala Cys Met Ile Glu Phe Cys Gly Gly
210 215 220

Gln Trp Ile Arg Thr Asp Leu Gly Asp Leu Ile Ser Val Val Tyr Asn
225 230 235 240

Ser Gly Ser Val Thr Leu Ser Phe Pro Lys Cys Glu Asp Lys Thr Val
245 250 255

Gly Met Arg Gly Asn Leu Asp Asp Phe Ala Tyr Leu
260 265

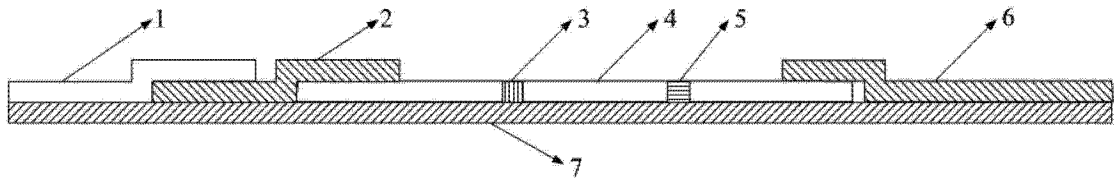


图 1

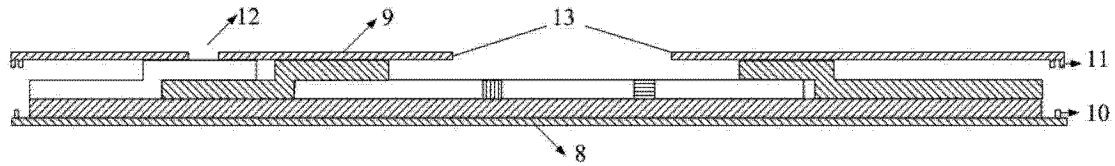


图 2

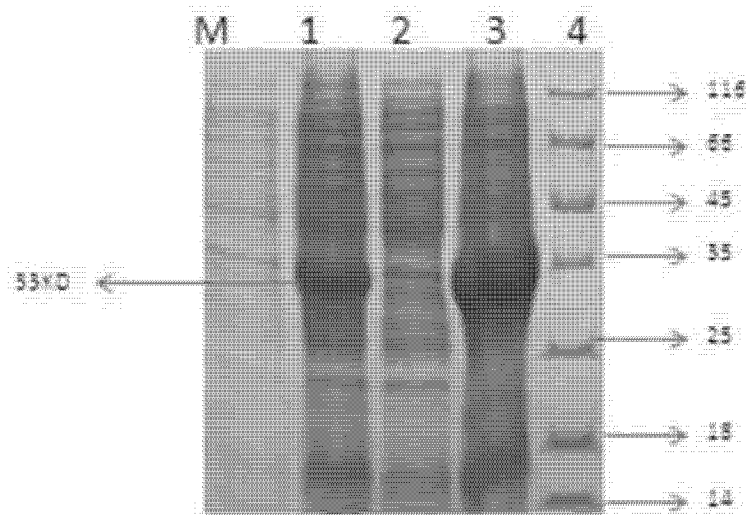


图 3

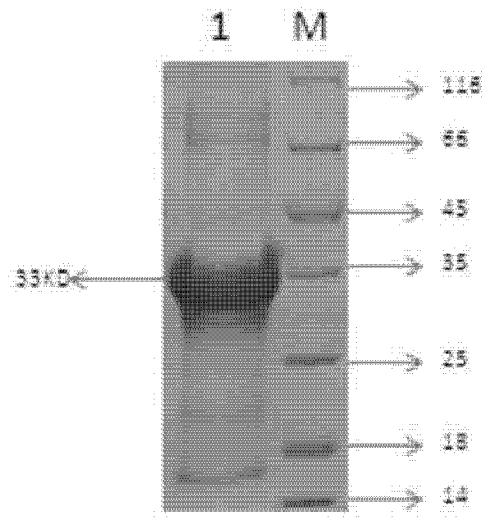


图 4