



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103525768 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201310433446. 9

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 :C201365 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 郑晓聪 钟松清 何俊强 谭攀 贾鹏 王津津 史秀杰 兰文升 于力 刘荭 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)

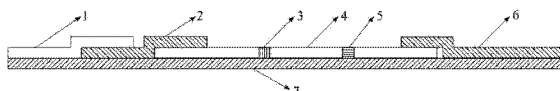
权利要求书1页 说明书9页
序列表4页 附图2页

(54) 发明名称

抗 SVCV 单克隆抗体 4F9 及其制备与应用

(57) 摘要

本申请公开了一种抗鲤春病毒血症病毒单克隆抗体 4F9, 及其制备与应用。该单克隆抗体由杂交瘤细胞株 SVCV-4F9 分泌, 该细胞株的保藏号为 CCTCC No :C201365。该杂交瘤细胞株 SVCV-4F9 能稳定产生单克隆抗体 4F9, 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, 其采用胶体金免疫层析检测技术, 具有较好的灵敏度、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、检测结果直观且检测成本低, 可满足食品安全、屠宰、检测机构等的检测要求, 特别适用于现场检测。



1. 保藏号为 CCTCC C201365 的杂交瘤细胞株 SVCV-4F9。
2. 一种抗鲤春病毒血症病毒单克隆抗体,其特征在於:所述抗体由保藏号 CCTCC C201365 的杂交瘤细胞株 SVCV-4F9 产生。
3. 根据权利要求 1 所述的杂交瘤细胞株 SVCV-4F9 在制备鲤春病毒血症病毒检测试剂或设备中的应用。
4. 如权利要求 2 所述的抗鲤春病毒血症病毒单克隆抗体在制备鲤春病毒血症病毒检测试剂或设备中的应用。
5. 一种鲤春病毒血症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 所述的抗鲤春病毒血症病毒单克隆抗体。
6. 根据权利要求 5 所述的鲤春病毒血症病毒快速检测试纸条,其特征在於:所述的抗鲤春病毒血症病毒单克隆抗体包附胶体金。
7. 根据权利要求 5 或 6 所述的快速检测试纸条在鲤春病毒血症病毒检测中的应用。
8. 一种鲤春病毒血症病毒检测试剂盒,其特征在於:该试剂盒包括如权利要求 5 或 6 中所述的鲤春病毒血症病毒快速检测试纸条。
9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒在鲤春病毒血症病毒检测中的应用。
10. 一种用于制备权利要求 1 所述的杂交瘤细胞株 SVCV-4F9 的蛋白,其特征在於,所述蛋白的氨基酸序列包含 SEQ ID NO. 1 所示的序列。

抗 SVCV 单克隆抗体 4F9 及其制备与应用

技术领域

[0001] 本申请涉及鲤春病毒血症病毒检测领域,特别涉及一种抗鲤春病毒血症病毒(SVCV)单克隆抗体 4F9 及其制备与应用。

背景技术

[0002] 鲤春病毒血症(Spring viraemia of carp, SVC)是严重影响鲤科鱼类的一种严重的传染性疾病,过去主要流行于欧洲一些国家(奥地利、比利时、法国、德国、英国、匈牙利、意大利、西班牙和前斯洛伐克、苏联和南斯拉夫的部分地区),并对这些国家的养殖鲤鱼造成严重的经济损失。病鱼体色发黑、呼吸困难、运动失调(侧游,顺水漂流或游动异常)、腹部膨大、眼球突出、肛门红肿、皮肤和鳃渗血。

[0003] 该病的病原为鲤春病毒血症病毒(Spring viraemia of carp virus, SVCV),属于弹状病毒科水疱病毒属,含有 1 个线状、反义、单链的 RNA,包含有 5 个结构蛋白,分别为核蛋白(N)、磷蛋白(P)、膜蛋白(M)、糖蛋白(G)和依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(L-蛋白)。

[0004] 鉴于 SVC 所引起的巨大危害,已被列入世界动物卫生组织(OIE)疫病名录,同时在我国,也将其列为一类动物疫病。

[0005] 关于 SVC 检测和确诊方法目前主要根据 OIE 所推荐的标准进行。对 SVC 的病原学诊断需要用电镜镜检、免疫荧光观察组织切片或分离病原等方法进行。OIE 推荐用 FHM 和 EPC 细胞系来分离病毒。然后用血清学方法如中和实验、免疫荧光或 ELISA 技术或核酸检测方法如聚合酶链式反应(PCR)可对分离出的病毒进行鉴定。CN102876810A 采用 RT-PCR 的方法检测鲤春病毒血症病毒;CN102876811A 专利也公布了一种 RT-LAMP 检测试剂盒。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,并且采用灭活毒株免疫动物获得免疫血清,但这种方法需要增殖大量的病毒并对其纯化,生产血清成本高,过程复杂,限制了抗血清的大量生产。

[0006] 20 世纪 80 年代兴起的胶体金免疫层析检测,基于血清学检测原理,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 SVCV 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鲤春病毒血症病毒(SVCV)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鲤春病毒血症病毒检测中的应用,特别的提供了一种特异性高、灵敏度高的鲤春病毒血症病毒(SVCV)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鲤春病毒血症病毒(SVCV)单克隆抗体的杂交瘤细胞

株 SVCV-4F9, 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 C201365。

[0011] 本申请公开了一种由上述保藏号 CCTCC C201365 的杂交瘤细胞株 SVCV-4F9 产生的抗 SVCV 单克隆抗体, 在本申请中也将该抗体称为抗 SVCV 单克隆抗体 4F9(或简称为单克隆抗体 4F9)。

[0012] 本申请同时公开了保藏号 CCTCC C201365 的杂交瘤细胞株 SVCV-4F9 在制备 SVCV 检测试剂或设备中的应用。

[0013] 本申请还公开了上述抗 SVCV 单克隆抗体 4F9 在制备 SVCV 检测试剂或设备中的应用。

[0014] 本申请提供了一种 SVCV 快速检测试纸条, 该试纸条包含上述抗 SVCV 单克隆抗体 4F9。

[0015] 进一步的, 上述 SVCV 快速检测试纸条中, 抗 SVCV 单克隆抗体 4F9 包附胶体金。

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

[0017] 本申请还提供了上述 SVCV 快速检测试纸条或 SVCV 检测试剂盒在 SVCV 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 C201365 的杂交瘤细胞株 SVCV-4F9 的蛋白, 该蛋白的氨基酸序列包含 SEQ ID NO. 1 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 SVCV-4F9 能稳定产生抗 SVCV 单克隆抗体 4F9, 该抗体特异性好、效价高, 可应用于 SVCV 快速检测领域。

[0021] 同时, 本申请提供了一种 SVCV 快速检测试纸条及其试剂盒, 将胶体金检测技术应用到 SVCV 的检测领域, 该检测试纸条具有特异性强、敏感性高、稳定性好, 同时具备可重复性和再现性等优点, 可以快速、准确、稳定检测鲤春病毒血症病毒, 且价格低廉。采用该试纸条检测速度快, 整个检测过程只需要 15-20 分钟, 操作简单, 无需特殊仪器, 肉眼观测结果, 结果稳定, 能满足食品安全、屠宰、检测机构的检测要求, 更方便于现场检测。

附图说明

[0022] 图 1 为本申请具体实施方式中的一种鲤春病毒血症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实施例 1 中融合蛋白的原核表达定位分析结果图(12h);

[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纯化分析结果图(12h)。

[0025] 保藏信息

[0026] 培养物名称: 杂交瘤细胞株 SVCV-4F9

[0027] 保藏日期: 2013 年 6 月 6 日

[0028] 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)

[0029] 保藏编号 :CCTCC C201365

具体实施方式

[0030] 本申请采用序列为 SEQ ID NO. 1 所示的蛋白 SVCV glycoprotein 作为免疫原,制备得到了杂交瘤细胞株 SVCV-4F9。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 SVCV 单克隆抗体 4F9。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 SVCV 单克隆抗体 4F9 具有良好的抗原性,与天然抗原的亲和力强,且特异性好、抗体效价高,可以作为 SVCV 多种检测方法中的重要试剂原料。该抗 SVCV 单克隆抗体 4F9 特别适用于 SVCV 快速检测领域,尤其适用于 SVCV 胶体金免疫层析检测法。

[0031] 由抗 SVCV 单克隆抗体 4F9 制备得到的 SVCV 胶体金快速检测试纸条,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 SVCV 检测试剂盒,其 SVCV 快速检测试纸条则是该试剂盒的核心。本申请提供的试纸条及其试剂盒生产和检测成本低。使用该试纸条不需另配其它仪器、设备和试剂,节省大量仪器、设备和附加试剂费用,专业和非专业人士均可随时随地进行现场检测,节省检测成本。其应用范围广,便于普遍推广,而且方便携带和保存,能满足不同层次人员的需要,包括专业化验、海关检疫、卫生防疫、质量监测、畜产品加工、集约化养殖和个体养殖等,具有广阔的市场前景和较好的经济、社会效益。同时,该试纸条和试剂盒可快速检测,10-15 分钟即可完成检测。由于不需特殊仪器设备,且操作简单,一步完成,无需专业人员操作,因此特别适用于现场操作。

[0032] 本申请中的单克隆抗体 4F9 除了应用于上述胶体金免疫层析检测试纸条外,还可以用于其他 SVCV 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 4F9 直接或间接结合其他信号基团(如磁性微球、辣根过氧化物酶等),或将本申请所述的单克隆抗体 4F9 作为包被抗体(例如 ELISA),则可用于其他形式的 SVCV 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 SVCV 检测试剂或设备。

[0033] 此外,本申请中所采用的鲤春病毒血症病毒毒株为 SVCV-2004714,由深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心提供。

[0034] 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。

[0035] 实施例一:鲤春病毒血症病毒膜蛋白的表达

[0036] 根据 NCBI 公布的登录号为 AY527273 的序列,选取鲤春病毒血症病毒膜蛋白 glycoprotein[Spring viraemia of carp virus] 为鲤春病毒血症病毒抗原检测位点,利用抗原决定簇分析软件分析整个序列,最后选择一段免疫原性强、特异性高的蛋白作为免疫原,该蛋白的氨基酸序列为 SEQ ID NO. 1,合成蛋白对应的 DNA 序列为 SEQ ID NO. 2。将这段 DNA (序列如 SEQ ID NO. 2 所示)插入原核表达载体 PET28e 中,测序鉴定。用 IPTG 诱导表达,分离纯化得到蛋白 SVCV 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:

[0037] (1) 融合蛋白的原核表达

[0038] ① 培养

[0039] 挑取单菌落于试管中(5mL LB 培养基,50ug/mL 氨苄青霉素)37℃,220rpm/min 过夜培养。

[0040] 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℃,180rpm/min 扩大培养。

[0041] 当OD值达到0.6左右时,添加终浓度为0.6mM的IPTG,37℃,120rpm/min 诱导12h。

[0042] 收集菌体并用PBS缓冲液悬浮。

[0043] ②超声破碎菌体

[0044] 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)。

[0045] 超声完毕,8000rpm/min,4℃,离心15min,收集上清和沉淀。

[0046] 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。

[0047] ③镍琼脂糖亲和层析

[0048] 用10倍柱床体积的Binding buffer清洗平衡柱子,流速60ml/h。

[0049] 样品(溶解液上清)上柱,流速为45ml/h,收集穿透液。

[0050] 10倍柱床体积的Binding buffer清洗柱子,流速60ml/h。

[0051] Eulte Buffer洗脱,流速45ml/h,收集洗脱液。

[0052] 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。

[0053] 注:Binding Buffer(PBS,8M尿素15mM咪唑,300mM NaCl,0.5%TritonX-100,pH=8.0)Eulte Buffer(PBS,8M尿素,500mM咪唑,pH=8.0)

[0054] (2)融合蛋白的表达及定位

[0055] 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2,图2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。

[0056] (3)融合蛋白的纯化

[0057] 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3。图3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。

[0058] 实施例二:抗鲤春病毒血症病毒单克隆抗体的制备:

[0059] (1)共选取8周龄BALB/C小鼠5只,免疫程序如下:

[0060] 首免:以SVCV glycoprotein作为免疫原,以Quick Antibody-Mouse5W作为免疫佐剂,免疫剂量为10 μ g/只(10 μ g免疫原+10 μ Quick Antibody-Mouse5W+生理盐水80 μ l),大腿肌肉注射。

[0061] 加强免疫:于首免后第21天进行,免疫剂量为10 μ g/只(10 μ g免疫原+10 μ Quick Antibody-Mouse5W+生理盐水80 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SVCV悬液的血清抗体效价。若效价达到1:5000,即可用于细胞融合。

- [0062] 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;
- [0063] 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;
- [0064] 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;
- [0065] 用间接 ELISA 法以 0.5 μg/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 C201365 的杂交瘤细胞株 SVCV-4F9。
- [0066] (2) 单抗的大量制备:
- [0067] 本例中采用腹水法大量制备单克隆抗体。将杂交瘤细胞株 SVCV-4F9 扩大培养,待细胞浓度达 5×10⁵ 个/mL 时停止换液,直至细胞全部死亡,收集培养液,测定其 ELISA 效价;
- [0068] 给腹腔注射液体石蜡 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 SVCV 病毒悬液包被酶标板测其 ELISA 效价。
- [0069] (3) 单抗的纯化:
- [0070] 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;
- [0071] 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,边滴边搅拌;辛酸滴加完后,室温搅拌 30min;
- [0073] 于 4℃ 离心,12000rpm×30min,取上清,用滤纸过滤;
- [0074] 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;
- [0075] 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;
- [0076] 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。
- [0077] (4) 单克隆抗体特异性检测:
- [0078] 用纯化的单克隆抗体 4F9 分别与其他鱼类病毒(锦鲤疱疹病毒(KHV)、传染性造血组织坏死病毒(IHNV)、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(EHNV)) 包被的 ELISA 板反应,鉴定单克隆抗体的特异性。
- [0079] 实施例三:胶体金快速检测试纸条的制备
- [0080] (1) 胶体金颗粒的制备
- [0081] 取 1% 氯金酸溶液 1ml,加 99ml 超纯水成终浓度 0.01% 的氯金酸溶液,加热沸腾后,取 1% 柠檬酸三钠 1.6ml 一次性迅速加入煮沸的氯金酸溶液中,继续加热至溶液由淡黄色转为蓝黑色最终变为亮红色,颜色稳定后继续加热 5min,室温冷却,补充失水至原体积。
- [0082] (2) 胶体金-抗体复合物试剂的制备与纯化:
- [0083] 取 100ml 胶体金溶胶,用 0.1mol/L 碳酸钾调节金溶胶至所需 pH,大约调到 pH8.0;
- [0084] 迅速向金溶胶中加入最佳标记量的抗 SVCV 单克隆抗体 4F9(10ug/ml) 搅拌 2-3 分

钟充分混合,室温下反应 10 分钟;

[0085] 迅速加入 10ml10% 牛血清白蛋白 (BSA) 溶液,充分混合,室温下反应 10 分钟;

[0086] 取胶体金溶液至离心管中于 13000 转 4℃ 冷冻离心机离心 30 分钟,小心吸去上清液(切忌倾倒);

[0087] 将沉淀悬浮于 1/10 体积含 0.5mg/ml BSA 的磷酸缓冲液中,置 4℃ 保存。

[0088] (3) 固相硝酸纤维素(NC)膜的活化

[0089] 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 SVCV 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),包被羊抗鼠 IgG(2mg/ml)于质控区,定义为质控线(C),且两者间距 4-10mm,优选 6mm。

[0090] 其中,该抗 SVCV 多克隆抗体可通过以下方法制备得到:

[0091] 将实施例 1 中制备得到的 SVCV glycoprotein 作为免疫原,以 Quick Antibody-Rabbit5W 作为免疫佐剂,免疫剂量为 30 μg/只(30 μg 免疫原+50 μL Quick Antibody-Rabbit5W),再用生理盐水补充至 100ul,每针次 100ul,大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。

[0092] 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。

[0093] 经过 1 次初免,1 次加强免疫后,兔抗血清效价可达 1:30000 以上,具有很高的抗血清效价。

[0094] 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。

[0095] (4) 胶体金结合垫的制备:

[0096] 取 40 μL 的胶体金-抗体复合物试剂用金标稀释液进行 3 倍稀释,裁取 7mm×10cm 的玻璃纤维素膜,浸泡于上述稀释后的胶体金-抗体复合物溶液中,再于室温洁净条件真空干燥备用,所述金标稀释液为含 0.01M PBS、0.5% (质量百分含量) BSA、0.2% Twen-20 (体积百分含量)、2.5% 蔗糖(质量百分含量)的缓冲液。

[0097] (5) 样品垫的制备:

[0098] 截取 1.1cm×10cm 的玻璃纤维素膜,将其均匀浸泡于如下溶液中 10min,再在室温洁净条件真空干燥备用,所述溶液为含 0.01M PBS、0.5% (质量百分含量) BSA、0.2% Twen-20 (体积百分含量)的缓冲液。

[0099] (6) 试纸条的组装

[0100] 本例中的胶体金快速检测试纸条由样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜及吸水纸 4 个部分组成。样品垫和胶体金结合垫用玻璃纤维素膜,底板为双面胶聚乙烯塑料板。顺序装配,裁成宽度为 3mm 的检测试纸条。本例中试纸条的结构示意图如图 1 所示,该胶体金快速检测试纸条,包括样品垫 1、胶体金结合垫 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,胶体金结合垫 2 是由胶体金标记的抗 SVCV 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 SVCV 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。

[0101] (7) 待测样品的前处理

[0102] 当所述样品为鱼类组织时,病毒释放后,样品前处理方法为:

[0103] 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 $\leq 4\text{cm}$ 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 $\geq 6\text{cm}$,取肾、脾和脑;

[0104] 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 $\mu\text{g/mL}$ 双氢链霉素的双抗),转入 50ml 离心管,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。最后取孵育后的细胞悬液作为检测样品。

[0105] (8) 检测方法与判断标准

[0106] 将待检测样品滴加到试纸的样品垫上,水平放置,反应 10min。

[0107] 判断标准:若只在质控线 C 出现红色,则表示为阴性;若在试纸的质控线、检测线均出现红色,则判定为阳性。

[0108] 实施例四:胶体金快速检测试纸条的检测试验

[0109] (1) 样品中鲤春病毒血症病毒的检测

[0110] 抗体标记在胶体金颗粒上,当加入样本后,金标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 SVCV 可与胶体金标记的抗 SVCV 单克隆抗体相结合。当样本中的 SVCV 超过检测限时,检测线(T)显红色,多余的金标单克隆抗体与质控线(C)的羊抗鼠 IgG 二抗相结合显色,C 线显红色,形成 2 条红色印记为阳性;反之,待测样品中无 SVCV 时,胶体金标记抗体在向硝酸纤维素膜方向扩散的过程中,不能与抗 SVCV 多克隆抗体相结合,不能形成固相多克隆抗体-抗原-胶体金标记抗体复合物,因此 T 线不显色,胶体金标记抗体只能与羊抗鼠 IgG 二抗结合,C 线显红色,记为阴性;如果硝酸纤维素膜没有显示红色标记或 C 线不显色,则表明试纸条失效。

[0111] (2) 试纸条的敏感性试验:分别将已知病毒阳性细胞培养液 10 份经过倍比稀释,分别用试纸条进行检测,并且与病毒分离试验进行敏感性比较,结果表明试纸条的灵敏度为 100TCID₅₀, CV 值小于 15%。

[0112] (3) 试纸条的特异性试验之阻断试验:检测 SVCV 时显示为阳性,当将狗鱼弹状病毒(PFRV)、牙鲆弹状病毒(HRV)、传染性胰脏坏死病毒(IPNV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、传染性造血组织坏死病毒(IHNV)、病毒性出血性败血病毒(VHSV)、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(EHNV)等几种病毒阳性细胞培养液分别加入试纸的样品垫上,静置反应 10min 后,检测结果均为阴性,说明本试纸条特异性好,结果见表 1,其中“+”表示阳性,“-”表示阴性。

[0113] 表 1. 试纸的特异性试验

[0114]

检测 样品	SVCV	PFRV	HRV	IPNV	KHV	IHNV	VHSV	RSIV	GCHV	EHNV
检测 结果	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0115] (4) 试纸条的重复性试验：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试纸条的重复性，结果显示试纸条检测结果一致，说明该试纸条的重复性好。

[0116] (5) 胶体金快速检测试纸条的稳定性试验：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。将制备好的试纸条分为两组，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金标抗体的程度等。试纸条在 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，该试纸条在室温保存 12 个月内具有良好的性能稳定性。

[0117] (6) 试纸条的应用试验：采用制备的试纸条分别对已知患有 SVC 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 2 份假阳性结果，阴性符合率为 97.5% 以上，结果与 real time PCR 检测结果相差不大，说明本申请的试纸条可以对 SVCV 进行快速检测。

[0118] 表 2. 阳性样本检测结果

[0119]

样本 检测方法	阳性肾脏（20 份）	阳性脾脏（20 份）	阳性脑（20 份）
试纸条	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

[0120] 表 3. 阴性样本检测结果

[0121]

样本 检测方法	阴性肾脏（20 份）	阴性脾脏（20 份）	阴性脑（20 份）
试纸条	20 份阴性	19 份阴性	18 份阴性
real time PCR	20 份阴性	20 份阴性	20 份阴性

[0122] (7) 再现性试验 :将同一批次的试纸条由不同的人员在同一实验室或不同实验室下操作,根据试纸条显色结果进行判断,结果表明,检测结果一致,试纸条具有再现性。

[0123] 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 SVCV 单克隆抗体 4F9 及其制备与应用
- <130> DHC1310238
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 280
- <212> PRT
- <213> 鲤春病毒血症病毒膜蛋白 glycoprotein [Spring viraemia of carp virus]
- <400> 1

Ile Phe Val Pro Ser Gly Gln Asn Ile Ser Trp Gln Pro Val Ile Gln
 1 5 10 15

Pro Phe Asp Tyr Gln Cys Pro Ile His Gly Asn Leu Pro Asn Thr Met
 20 25 30

Gly Leu Ser Ala Thr Lys Leu Thr Ile Lys Ser Pro Ser Val Phe Ser
 35 40 45

Thr Asp Lys Val Ser Gly Trp Ile Cys His Ala Ala Glu Trp Lys Thr
 50 55 60

[0002]

Thr Cys Asp Tyr Arg Trp Tyr Gly Pro Gln Tyr Ile Thr His Ser Ile
65 70 75 80

His Pro Ile Ser Pro Thr Ile Asp Glu Cys Lys Arg Ile Ile Ser Arg
85 90 95

Ile Ala Ser Gly Thr Asp Glu Asp Leu Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys
100 105 110

Gly Trp Ala Ser Val Thr Thr Val Ser Asn Thr Asn Tyr Lys Val Val
115 120 125

Pro His Ser Val His Leu Glu Pro Tyr Gly Gly His Trp Ile Asp His
130 135 140

Glu Phe Asn Gly Gly Glu Cys Arg Glu Lys Val Cys Glu Met Lys Gly
145 150 155 160

Asn His Ser Ile Trp Ile Thr Asp Glu Thr Val Gln His Glu Cys Glu
165 170 175

Lys His Ile Glu Glu Val Glu Gly Ile Met Tyr Gly Asn Ala Pro Arg
180 185 190

Gly Asp Ala Ile Tyr Ile Asn Asn Phe Ile Ile Asp Lys His His Arg
195 200 205

[0003]

Val Tyr Arg Phe Gly Gly Ser Cys Arg Met Lys Phe Cys Asn Lys Asp
 210 215 220

Gly Ile Lys Phe Thr Arg Gly Asp Trp Val Glu Lys Thr Ala Glu Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Asn Ile Tyr Ala Asn Ile Pro Glu Cys Ala Asp Gly Thr Leu
 245 250 255

Val Ser Gly His Arg Pro Gly Leu Asp Leu Ile Asp Thr Val Phe Asn
 260 265 270

Leu Glu Asn Val Val Glu Tyr Thr
 275 280

<210> 2

<211> 840

<212> DNA

<213> 鲤春病毒血症病毒膜蛋白 glycoprotein [Spring viraemia of carp virus]

<400> 2

atatttgttc catccgggca gaatatatca tggcaacctg taattcagcc atttgattat 60

caatgtccaa tacacggaaa tetacctaac acaatgggat tgagtgccac caaattgaca 120

ataaaatctc catctgtctt cagtacagat aaagttcttg gatggatctg ccatgcagct 180

gaatggaaaa caacttgtga ttacagatgg tacggacccc aatatataac ccacagtatt 240

catccaatca gtctaccat agatgaatgc aagagaatca tttcaaggat tgcattcagga 300

actgatgaag atctggggtt tccccctcaa agttgggat gggcatctgt cacaacagtg 360

[0004]

tcaaatacta attacaaggt agtaecccat tetgttcatt tggagecgtgta cggaggacac	420
tggatcgatc atgaattcaa tgggggcgaa tgcagagaaa aagtgtgtga aatgaaaggg	480
aaccactcta tttgatcac agatgagacc gtgcagcatg aatgtgaaaa gcacatagag	540
gaagttgaag gaattatgta cgggaatgct cggagagggg atgcaatata tattaacaac	600
tttattatag ataaacatca tagagtatac agattcgggg ggtcttgtcg aatgaaattc	660
tgtaataaag atggtataaa attcacaaga ggagactggg tagaaaaaac agctgaaaca	720
ttgacgaata tttatgcaaa tatacctgaa tgtgctgatg gaacgttggt atctggteac	780
cgacctggat tagacttgat tgacacagtc ttcaatttgg aaaatgtggt agaatafact	840

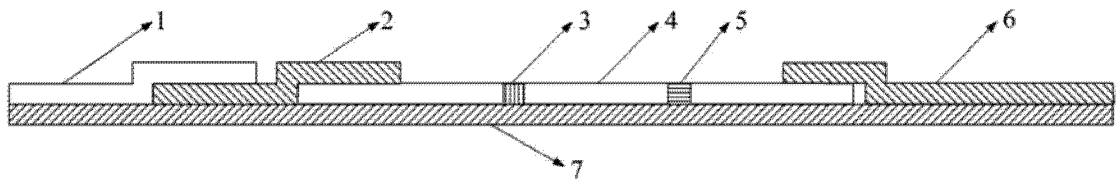


图 1

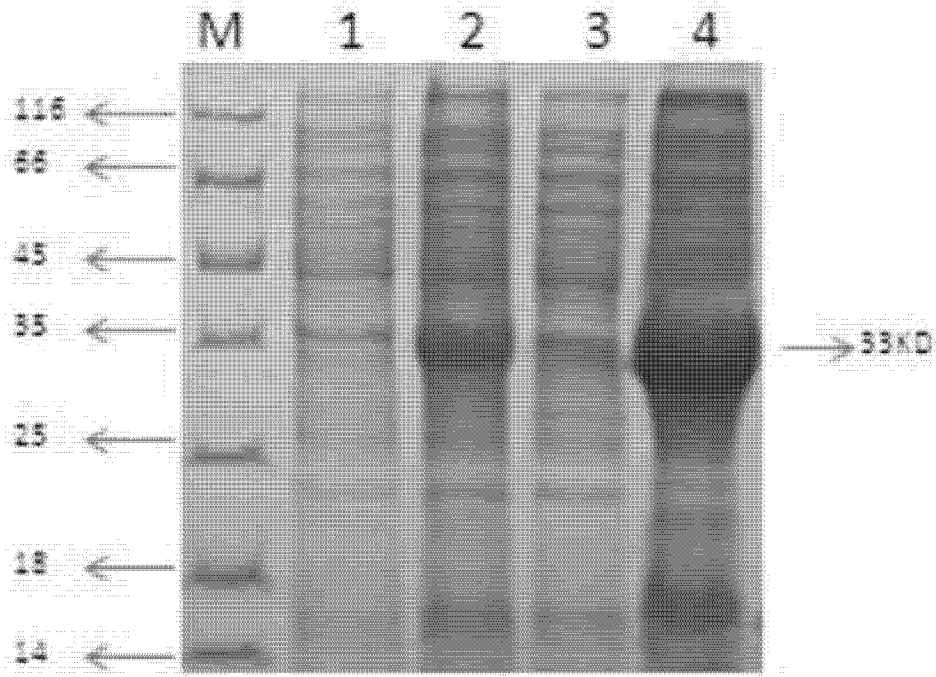


图 2

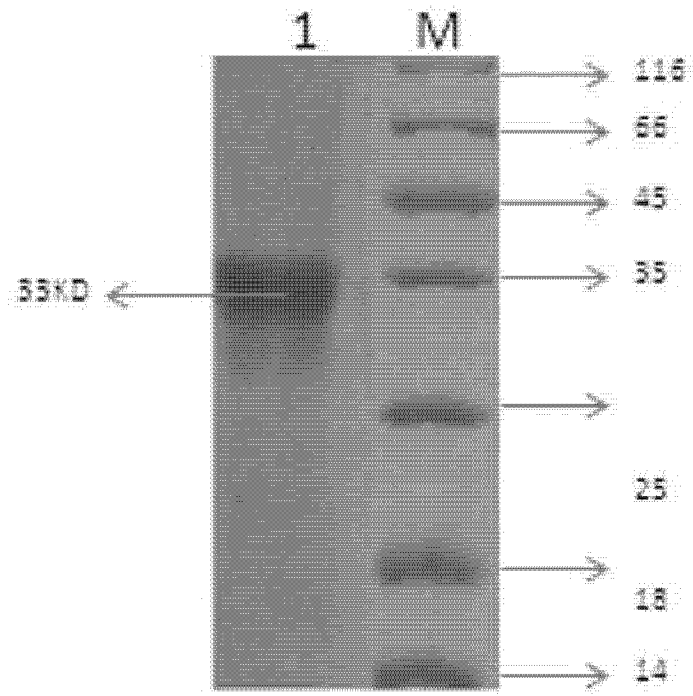


图 3