



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106814186 A

(43)申请公布日 2017.06.09

(21)申请号 201611222068.X

(22)申请日 2016.12.27

(83)生物保藏信息

CGMCC NO.8011 2013.07.24

(71)申请人 深圳金石邦信股权投资基金管理有限公司

地址 518052 广东省深圳市前海深港合作  
区前湾一路1号A栋201室(入驻深圳市  
前海商务秘书有限公司)

(72)发明人 黄威权 赵锋 吕葆真

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页

(54)发明名称

一种猪支原体科特异型单克隆抗体及其在  
临床检测中的应用

(57)摘要

本发明涉及兽用生物制品领域,具体公开猪支原体科特异型单克隆抗体及其在临床检测中的应用,用猪肺炎支原体做免疫原,制备了猪科支原体单克隆抗体,成功筛选到一株能稳定分泌效价高、特异性强的猪支原体科单克隆抗体杂交瘤细胞株2G2,其产生的单克隆抗体能同时和肺炎支原体及解脲脲原体发生免疫反应,并用其建立了猪支原体免疫检测试剂盒,本发明制备特异性强、效价高的猪支原体单克隆抗体,用其制备猪支原体病免疫诊断试剂盒,该试剂盒灵敏、准确、操作简便、采样无需采血,不给动物造成损害;该试剂盒能早期、快捷、准确地诊断猪支原体病;该试剂盒既能检测支原体病,也能检测解脲脲原体病,大大减低成本并提高检测效能。

1. 一种猪支原体科特异型单克隆抗体,其特征在于:选用猪肺炎支原体做免疫原,筛选出猪支原体科单克隆抗体杂交瘤细胞株2G2,其产生的单克隆抗体能同时和肺炎支原体及解脲脲原体发生免疫反应,其生物保藏号为CGMCC NO.8011。

2. 制备权利要求1所述的一种猪支原体科特异型单克隆抗体的方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

S1. 选取免疫原及Sp20小鼠骨髓瘤细胞株

选用猪肺炎支原体(168株)疫苗(生产批号:119052)作免疫原;

S2. 免疫动物及免疫

取雌性8周龄的Ba1b/C小鼠10只,以每只0.2ml猪肺炎支原体疫苗的量,腹腔注射免疫小鼠,于第1次免疫后第7、14、28天分别以猪肺炎支原体疫苗追加免疫一次,免疫注射疫苗量和第一次相同,第31天取脾细胞进行细胞融合;

S3. 细胞融合及培养

(1) 免疫脾细胞的制备;

(2) SP20小鼠骨髓瘤细胞悬液的制备;

(3) 细胞融合;

S4. 抗体阳性孔检测;

S5. 克隆化;

S6. 杂交瘤细胞的冻存;

S7. 腹水型单克隆抗体的制备;

S8. 单克隆抗体的鉴定(采用ELISA法)

共获得了3株能稳定分泌猪肺炎支原体单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为2G2, 1A5和1G6,经效价检测,以上3种腹水型单克隆抗体的效价为 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^5$ ;特异性检测显示,2G2杂交瘤细胞产生的腹水型单克隆抗体除了猪支原体病外,不和蓝耳病、圆环病、猪瘟、伪狂犬病的病原体发生交叉反应;结果显示,2G2除了与肺炎支原体产生免疫反应外,还能和解脲脲原体起免疫反应。

3. 权利要求1所述的猪支原体科特异型单克隆抗体在临床检测中的应用,其特征在于:以所述猪支原体科单克隆抗体杂交瘤细胞株2G2产生的单克隆抗体为基础,制备了一种猪支原体免疫检测试剂盒。

4. 一种猪支原体免疫检测试剂盒,其特征在于:包括样本稀释液25ml、阳性对照液0.5ml~1ml、阴性对照液0.5ml~1ml、猪肺炎支原体单克隆抗体液体2.5ml~3ml、酶标抗体液2.5ml~3ml、显色剂A2.5ml~3ml、显色剂B 0.2~0.4g、洗涤液35ml $\times$ 4。

5. 根据权利要求4所述猪支原体免疫检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒为免疫ELISA试剂盒。

6. 使用权利要求4所述猪支原体免疫检测试剂盒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 样本采集:用棉拭子采集病猪口鼻及尿殖道的分泌物,放入采样管内,加入20滴样本稀释液,充分搅动棉拭子,使样本充分游离到稀释液中;

(2) ELISA反应操作步骤

a. 将采集有样本的小管按顺序从1到22写上编号;

b. 取出24孔培养板,用滴管将样本采集管液按顺序分别加到培养板的小孔内,每个小

孔分别加两滴样本液稀释液到1~22小孔,一次可加22个样本,第23号小孔加入阳性对照液两滴,第24号小孔加阴性对照液两滴,在常温下静置40~60分钟,甩去孔内液体;

c.向培养板各小孔加入洗涤液每孔5滴,静置2~3分钟,甩去孔内液体,再重复两次,最后拍干孔内残留液体;

d.向各小孔加猪肺炎支原体单克隆抗体液两滴,在常温下静置20~40分钟,甩去孔内液体;

e.重复c步骤;

f.向各小孔加酶标抗体液各两滴,在常温下静置30~40分钟,甩去孔内液体;

g.同c步骤,但共重复5次;

h.将显色剂A液倒入显色剂B管,拧紧盖子,震荡B管,待粉剂完全溶解后,加到培养板各小孔内,每孔两滴,加液后,常温下避光静置15~20分钟;

(3)结果判定:在白色背景下,观察小孔颜色,如果操作无误,第23号小孔为阳性对照孔应呈橙黄色,第24号小孔为阴性对照孔,应呈无色或接近无色,第1~22号小孔,如呈橙黄色,表明样本为猪肺炎支原体阳性反应,若为无色或接近无色,表明样本为阴性反应。

## 一种猪支原体科特异型单克隆抗体及其在临床检测中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及兽用生物制品领域,特别是指一种猪支原体科特异型单克隆抗体及其在临床检测中的应用。

### 背景技术

[0002] 越来越多的研究表明,猪支原体是引起猪呼吸道及泌尿生殖道疾病的重要病原体之一,世界范围内大部分养殖猪都易感染猪支原体,而且任何年龄段的猪都会被侵害;据报道,美国养殖猪感染率为99%,英国养殖猪感染率为70%,法国养殖猪感染率为60%,比利时、加拿大养殖猪感染率为80%,德国、荷兰养殖猪感染率为50%,全世界范围平均养殖猪感染率为50%~80%。猪肺炎支原体病的典型症状是病猪咳嗽、呼吸困难、喘气,故有人称之为喘气病;猪解脲脲原体病则引起猪尿殖道感染,引起流产和不育该病发病率高,死亡率低,患病猪食欲不振、发育不良、生长缓慢,饲料转化率低。更为严重的是猪患了该病之后,很容易继发感染其他细菌和病毒病,使病程延长、病情加重,甚至死亡,经济损失加剧。

[0003] 对该病的诊断迄今仍主要根据流行病学分析、临床症状观察、病理解剖观察分析来进行初步诊断。迄今未见先进的检测方法,如免疫检测方法,基因检测方法商品化的试剂盒应用于该病检测诊断也未见相关的专利报道。

[0004] 对该病的预防迄今主要采取疫苗接种,除了接种猪肺炎支原体疫苗外,还要做好其他疾病的免疫接种工作,有计划地做好猪瘟、伪狂犬病、细小病病毒、乙型脑炎、传染性胸膜肺炎、猪丹毒、仔猪副伤寒等免疫接种工作,确保猪群良好的免疫状态。在治疗方面,目前主要采用化学药物抗生素治疗,如用泰乐菌素、四环素、土霉素、卡那霉素、金霉素及喹诺酮类等。至今未见采用无毒、无副作用的生物药物,如卵黄抗体及特异性转移因子应用于对猪肺炎支原体并进行防治的报道。

[0005] 迄今国内对猪支原体病的诊断仍停留在对流行病学的分析、临床症状的观察分析以及病理解剖观察来进行判断,这些较初始的诊断方法流程长、费力费时,而且很不精准。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种猪支原体科特异型单克隆抗体及其在临床检测中的应用,用猪肺炎支原体做免疫原,制备了猪科支原体单克隆抗体,成功筛选到一株能稳定分泌效价高、特异性强的猪支原体科单克隆抗体杂交瘤细胞株2G2,其产生的单克隆抗体能同时和肺炎支原体及解脲脲原体发生免疫反应,并用其建立了猪支原体免疫检测试剂盒。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用了以下的技术方案:一种猪支原体科特异型单克隆抗体,选用猪肺炎支原体做免疫原,筛选出猪支原体科单克隆抗体杂交瘤细胞株2G2,其产生的单克隆抗体能同时和肺炎支原体及解脲脲原体发生免疫反应,其生物保藏号为CGMCC NO.8011,保藏单位代码为CGMCC-中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏单位地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏日期为2013年7月24日,分类命名为猪肺炎支原体单克隆抗体杂交瘤细胞株,该生物材料为存活状态。

[0008] 制备猪支原体科特异型单克隆抗体的方法,具体包括以下步骤:

[0009] S1.选取免疫原及Sp20小鼠骨髓瘤细胞株

[0010] 选用猪肺炎支原体(168株)疫苗(生产批号:119052)作免疫原;

[0011] S2.免疫动物及免疫

[0012] 取雌性8周龄的Ba1b/C小鼠10只,以每只0.2ml猪肺炎支原体疫苗的量,腹腔注射免疫小鼠,于第1次免疫后第7、14、28天分别以猪肺炎支原体疫苗追加免疫一次,免疫注射疫苗量和第一次相同,第31天取脾细胞进行细胞融合;

[0013] S3.细胞融合及培养

[0014] (1)免疫脾细胞的制备;

[0015] (2)SP20小鼠骨髓瘤细胞悬液的制备;

[0016] (3)细胞融合;

[0017] S4.抗体阳性孔检测;

[0018] S5.克隆化;

[0019] S6.杂交瘤细胞的冻存;

[0020] S7.腹水型单克隆抗体的制备;

[0021] S8.单克隆抗体的鉴定(采用ELISA法)

[0022] 共获得了3株能稳定分泌猪肺炎支原体单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为2G2,1A5和1G6,经效价检测,以上3种腹水型单克隆抗体的效价为 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-5}$ ;特异性检测显示,2G2杂交瘤细胞产生的腹水型单克隆抗体除了猪支原体病外,不和蓝耳病、圆环病、猪瘟、伪狂犬病的病原体发生交叉反应;结果显示,2G2除了与肺炎支原体产生免疫反应外,还能和解脲脲原体起免疫反应。

[0023] 猪支原体科特异型单克隆抗体在临床检测中的应用,以所述猪支原体科单克隆抗体杂交瘤细胞株2G2产生的单克隆抗体为基础,制备了一种猪支原体免疫检测试剂盒。

[0024] 一种猪支原体免疫检测试剂盒,包括样本稀释液25ml、阳性对照液0.5ml~1ml、阴性对照液0.5ml~1ml、猪肺炎支原体单克隆抗体液体2.5ml~3ml、酶标抗体液2.5ml~3ml、显色剂A2.5ml~3ml、显色剂B 0.2~0.4g、洗涤液35ml $\times$ 4。

[0025] 其中,所述试剂盒为免疫ELISA剂盒。

[0026] 使用所述猪支原体免疫检测试剂盒的方法,包括以下步骤:

[0027] (1)样本采集:用棉拭子采集病猪口鼻及尿殖道的分泌物,放入采样管内,加入20滴样本稀释液,充分搅动棉拭子,使样本充分游离到稀释液中;

[0028] (2)ELISA反应操作步骤

[0029] a.将采集有样本的小管按顺序从1到22写上编号;

[0030] b.取出24孔培养板,用滴管将样本采集管液按顺序分别加到培养板的小孔内,每个小孔分别加两滴样本液稀释液到1~22小孔,一次可加22个样本,第23号小孔加入阳性对照液两滴,第24号小孔加阴性对照液两滴,在常温下静置40~60分钟,甩去孔内液体;

[0031] c.向培养板各小孔加入洗涤液每孔5滴,静置2~3分钟,甩去孔内液体,再重复两次,最后拍干孔内残留液体;

[0032] d.向各小孔加猪肺炎支原体单克隆抗体液两滴,在常温下静置20~40分钟,甩去孔内液体;

[0033] e.重复c步骤;

[0034] f.向各小孔加酶标抗体液各两滴,在常温下静置30~40分钟,甩去孔内液体;

[0035] g.同c步骤,但共重复5次;

[0036] h.将显色剂A液倒入显色剂B管,拧紧盖子,震荡B管,待粉剂完全溶解后,加到培养板各小孔内,每孔两滴,加液后,常温下避光静置15~20分钟;

[0037] (3) 结果判定

[0038] 在白色背景下,观察小孔颜色,如果操作无误,第23号小孔为阳性对照孔应呈橙黄色,第24号小孔为阴性对照孔,应呈无色或接近无色,第1~22号小孔,如呈橙黄色,表明样本为猪肺炎支原体阳性反应,若为无色或接近无色,表明样本为阴性反应。

[0039] 本发明的有益效果在于:本发明制备特异性强、效价高的猪支原体单克隆抗体,用其制备猪支原体病免疫诊断试剂盒,该试剂盒灵敏、准确、操作简便、采样无需采血,不给动物造成损害。

[0040] 该试剂盒能早期、快捷、准确地诊断猪支原体病。该试剂盒既能检测支原体病,也能检测解脲脲原体病,大大减低成本并提高检测效能。

## 具体实施方式

[0041] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0042] 为了克服我国对猪支原体病相对落后的诊断及防治方法,我们成功制备了猪支原体病单克隆抗体,并用其建立猪支原体病免疫检测试剂盒,其主要特点是灵敏、准确、操作简便,很快可以报结果,无需任何附加设备可在现场进行检测,采样无需抽血,不会给动物造成损害。对该病进行精准的早期诊断才能对其进行及时有效防治。另外,它能同时检测猪肺炎支原体病及猪解脲脲原体病,大大降低了猪支原体病检测成本,而且扩大了监测效能,起到事半功倍的效果。

[0043] (一) 猪支原体病单克隆抗体制备

[0044] 1. 免疫原及Sp20小鼠骨髓瘤细胞株

[0045] 选用猪肺炎支原体(168株)疫苗(生产批号:119052)作免疫原。Sp20小鼠骨髓瘤细胞株从第四军医大学细胞工程中心购入。

[0046] 2. 免疫动物及免疫

[0047] 取雌性8周龄的Balb/C小鼠10只,以每只0.2ml猪肺炎支原体疫苗的量,腹腔注射免疫小鼠,于第1次免疫后第7、14、28天分别以猪肺炎支原体疫苗追加免疫一次,免疫注射疫苗量和第一次相同。第31天取脾细胞进行细胞融合。

[0048] 3. 细胞融合及培养

[0049] (1) 免疫脾细胞的制备

[0050] ①取免疫小鼠脾脏,放入盛有5ml不完全培养液(不加小牛血清的1640培养液)的平皿中,置200目的不锈钢网上,使脾细胞全部通过网孔挤压到溶液中。

[0051] ②将脾细胞悬液转入50ml离心管中,加不完全培养液至30ml,混匀后,经1000rpm

离心5分钟,弃上清。

[0052] ③用不完全培养液30ml倒入有沉淀脾细胞的离心管内,轻轻震动,使脾细胞重新变成悬液,再经1000rpm离心5分钟,弃去上清。用不完全培养液将沉淀细胞重悬至10ml,混匀,用细胞计数器计数,总细胞数调为 $1 \times 10^8$ 。

[0053] (2) SP20小鼠骨髓瘤细胞悬液的制备

[0054] ①将SP20小鼠骨髓瘤细胞进行扩增培养。培养液为含20%小牛血清的RPMI-1640培养液,在CO<sub>2</sub>孵箱中培养,温度为37℃,CO<sub>2</sub>浓度为5%。

[0055] ②将4瓶扩增培养的骨髓细胞收集到50ml离心管内。

[0056] ③1000rpm离心5分钟,弃去上清。

[0057] ④加入30ml不完全培养液,轻轻震动,使细胞重新重悬于液体中,再经1000rpm离心5分钟,弃去上清。用不完全培养液将沉淀细胞重悬至10ml,混匀,用细胞计数器计数,总细胞数调至 $2 \sim 3 \times 10^7$ 。

[0058] (3) 细胞融合

[0059] ①分别吸取含 $1 \times 10^8$ 个脾细胞悬液和 $2 \sim 3 \times 10^7$ 个小鼠骨髓瘤细胞悬液各10ml,加到50ml离心管中,补加不完全培养液至30ml,充分摇匀。

[0060] ②1000rpm离心7分钟,弃去上清。

[0061] ③加体积浓度50%的融合剂聚乙二醇(PEG)溶液0.7ml。

[0062] ④加入25ml不完全培养液,使PEG稀释而失去促融作用。

[0063] ⑤800rpm离心7分钟,弃去上清。

[0064] ⑥加20ml的HAT培养液(含20%小牛血清的RPMI-1640培养液中加入2%的由次黄嘌呤(H)、氨基蝶呤(A)、胸腺嘧啶核苷(T)组成的选择性培养液),轻轻吸取沉淀细胞,使其重悬并混匀。

[0065] ⑦将细胞悬液加到辅有饲养细胞(小鼠腹腔巨噬细胞)的96孔培养板中,每孔0.1ml,将培养板放到37℃含CO<sub>2</sub>的体积浓度为5%的孵箱中培养。

[0066] 4. 抗体阳性孔检测(采用间接ELISA法)

[0067] ①用猪肺炎支原体H9亚型疫苗包被。

[0068] ②加入3中有克隆生长的孔中的培养上清100u1。

[0069] ③加入酶标抗鼠IgG抗体(从北京中杉金桥生物科技有限公司购入)100u1。

[0070] ④加底物液(含0.05%邻苯二胺溶液)100u1,室温避光显色10~20分钟。

[0071] ⑤结果判定:在酶联免疫检测仪492波长下测定OD值,空白对照调零,若待测孔OD值大于或等于阴性对照孔OD值2.1倍,则可判定为阳性孔,孔内生长有阳性克隆。

[0072] 5. 克隆化(采用有限稀释法)

[0073] 将96孔培养板中被检测为抗体阳性的孔标记出来。用加样器将孔内杂交瘤细胞反复吹打均匀后计数,然后用有限稀释法进行逐级稀释,再加到96孔板进行培养观察克隆生长,记录单克隆孔。并及时进行阳性检测。将阳性单克隆孔的细胞转到24孔板培养,待其增殖到一定数量后再转入细胞培养瓶中进行扩大培养(克隆化过程中每一步骤的培养条件相同:培养液为含20%小牛血清的RPMI-1640培养液,在CO<sub>2</sub>孵箱中培养,温度为37℃,CO<sub>2</sub>浓度为5%)。

[0074] 6. 杂交瘤细胞的冻存

[0075] 将呈对数生长期的杂交瘤细胞收集于离心管,1000rpm离心10分钟,弃去上清,加入1ml冻存液(含有30%小牛血清,60%RPMI-1640培养液,10%二甲基亚砷)混匀,然后加到冻存管,在-70℃低温冰箱过夜后转入液氮罐长期保存。

#### [0076] 7.腹水型单克隆抗体的制备

[0077] 将冻存的杂交瘤细胞复苏扩增培养,将扩增培养的杂交瘤细胞吹打下来,1000rpm离心10分钟,收集上清作亚型试验。加无血清培养液到沉淀的杂交瘤细胞中,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ,每只Balb/c小鼠腹腔注射0.5ml,接种杂交瘤细胞后,7—14天,拉颈脱臼处死小鼠,吸取腹水离心,收集上清,即为腹水型单克隆抗体,分装后置于-20℃冰箱,冻存备用。

#### [0078] 8.单克隆抗体的鉴定(采用ELISA法)

[0079] 我们共获得了3株能稳定分泌猪肺炎支原体单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为2G2,1A5和1G6,经效价检测,以上3种腹水型单克隆抗体的效价为 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-5}$ 。特异性检测显示,2G2杂交瘤细胞产生的腹水型单克隆抗体除了猪支原体病外,不和蓝耳病、圆环病、猪瘟、伪狂犬病的病原体发生交叉反应。说明其具有较强的特异性,可用其建立猪肺炎支原体病的检测试剂盒。结果显示,2G2除了与肺炎支原体产生免疫反应外,还能和解脲原体起免疫反应。结果见表1、表2。

[0080] 表1杂交瘤细胞株分泌单克隆抗体效价的检测结果表

[0081]

| 细胞株分泌的单抗 | 效价检测方法 | 检测结果      |
|----------|--------|-----------|
| 1A5      | ELISA  | $10^{-4}$ |
| 2G2      | ELISA  | $10^{-5}$ |
| 1G6      | ELISA  | $10^{-5}$ |

[0082] 表2杂交瘤细胞株分泌单抗的交叉试验结果

[0083]

| 细胞株<br>分泌的<br>单抗 | 与不同抗原(疫苗)免疫反应结果(ELISA法) |           |            |           |           |          |
|------------------|-------------------------|-----------|------------|-----------|-----------|----------|
|                  | 蓝耳病<br>疫苗               | 圆环病<br>疫苗 | 伪狂犬病<br>疫苗 | 猪支原体      |           | 猪瘟<br>疫苗 |
|                  |                         |           |            | 肺炎支<br>原体 | 解尿脲<br>原体 |          |
| 1A5              | -                       | -         | -          | +         | +         | +        |
| 2G2              | -                       | -         | -          | +         | +         | -        |
| 1G6              | -                       | -         | -          | +         | +         | +        |

#### [0084] (二)猪支原体免疫检测试剂盒

##### [0085] 1.猪肺炎支原体免疫检测试剂盒的组成

[0086] ①样本稀释液(0.85M、pH9.6的碳酸盐缓冲液) 25ml

- [0087] ②阳性对照液(含有猪肺炎支原体(168株)疫苗的样本稀释液) 0.5ml~1ml
- [0088] ③阴性对照液(含有非相关蛋白(如正常牛血清)的样本稀释液) 0.5ml~1ml
- [0089] ④猪肺炎支原体单克隆抗体液体(含有1:3000至1:5000浓度腹水型2G2单克隆抗体的PBS) 2.5ml~3ml
- [0090] ⑤酶标抗体液2.5ml~3ml
- [0091] ⑥显色剂A(有0.045%过氧化氢的pH 5.0的磷酸-柠檬酸缓冲液) 2.5ml~3ml
- [0092] ⑦显色剂B(含有0.5%邻苯二胺的葡萄糖粉) 0.2~0.4g
- [0093] ⑧洗涤液(含有0.05%Tween-20的pH7.4的PBS液) 35ml×4另外还包括24孔培养板一块、采样管22只、滴管25只、棉拭子22只。

## [0094] 2. 使用方法

[0095] 2.1样本采集用棉拭子采集病猪的分泌物(口、鼻、肛门分泌物),放入采样管内,加入20滴样本稀释液,充分搅动棉拭子,使样本充分游离到稀释液中,然后按后续操作步骤操作。(如无条件进行后续步骤操作,可将样本置于2~8℃冷藏保存,24小时可用,或是-20℃冷冻保存,4周内可用)。

## [0096] 2.2 ELISA反应操作步骤

[0097] a.将采集有样本的小管按顺序从1到22写上编号。

[0098] b.取出24孔培养板,用滴管将样本采集管液按顺序分别加到培养板的小孔内,每个小孔分别加两滴样本液稀释液到1~22小孔,一次可加22个样本。第23号小孔加入阳性对照液两滴,第24号小孔加阴性对照液两滴。在常温下静置40~60分钟,甩去孔内液体。

[0099] c.向培养板各小孔加入洗涤液每孔5滴,静置2~3分钟,甩去孔内液体,再重复两次,最后拍干孔内残留液体。

[0100] d.向各小孔加猪肺炎支原体单克隆抗体液两滴,在常温下静置20~40分钟,甩去孔内液体。

[0101] e.重复c步骤。

[0102] f.向各小孔加酶标抗体液各两滴,在常温下静置30~40分钟,甩去孔内液体。

[0103] g.同c步骤,但共重复5次。

[0104] h.将显色剂A液倒入显色剂B管,拧紧盖子,震荡B管,待粉剂完全溶解后,加到培养板各小孔内,每孔两滴。加液后,常温下避光静置15~20分钟。

## [0105] 2.3结果判定

[0106] 在白色背景下,观察小孔颜色。如果操作无误,第23号小孔为阳性对照孔应呈橙黄色,第24号小孔为阴性对照孔,应呈无色或接近无色。第1~22号小孔,如呈橙黄色,表明样本为猪肺炎支原体阳性反应,若为无色或接近无色,表明样本为阴性反应。

[0107] 实施例一,陕西长安县一猪养殖场养500头猪,因最近发现个别猪进食不佳,请求帮助检测是否有猪肺炎支原体病。我们随机取猪口腔黏液10例,用本免疫检测试剂盒检测,结果全部呈阴性反应。说明整个猪群不带有猪肺炎支原体病,个别猪进食不佳可能另有原因。

## [0108] ELISA反应结果表

[0109]

| 样本(口腔黏液) | 检测方法 | 检测结果(阳性+,阴性-) |
|----------|------|---------------|
|----------|------|---------------|

|    |       |   |
|----|-------|---|
| 1  | ELISA | - |
| 2  | ELISA | - |
| 3  | ELISA | - |
| 4  | ELISA | - |
| 5  | ELISA | - |
| 6  | ELISA | - |
| 7  | ELISA | - |
| 8  | ELISA | - |
| 9  | ELISA | - |
| 10 | ELISA | - |

[0110] 实施例二, 长安县另一个猪养殖场, 养猪300头, 其中种母猪8头, 公猪2头, 仔猪50头, 育肥猪240头。最近发现个别母猪咳嗽, 进食不佳。请求帮忙检测是否被染上猪肺炎支原体病。我们随机抽取10例口腔黏液, 用本试剂盒进行检测, 结果显示, 所有被检测的3例母猪全部为猪支原体阳性; 3例仔猪有2例是猪支原体阳性; 4例育肥猪有3例是猪支原体阳性, 说明猪群已感染了猪支原体, 要采取措施进行防治。

[0111] ELISA反应结果表

[0112]

| 样本(口腔黏液) | 检测方法  | 检测结果(阳性+, 阴性-) |
|----------|-------|----------------|
| 1母猪      | ELISA | +              |
| 2母猪      | ELISA | +              |
| 3母猪      | ELISA | +              |
| 4仔猪      | ELISA | +              |
| 5仔猪      | ELISA | +              |
| 6仔猪      | ELISA | -              |
| 7育肥猪     | ELISA | +              |
| 8育肥猪     | ELISA | +              |
| 9育肥猪     | ELISA | +              |
| 10育肥猪    | ELISA | -              |

[0113] 实施例三, 陕西蓝田县一养猪场, 刚进一批仔猪共100头, 请求帮助检测是否有猪肺炎支原体。我们随机抽取了10例仔猪口腔黏液, 用本试剂盒检测, 结果显示, 所有样本均为猪肺炎支原体阴性反应。说明新进仔猪不带有猪肺炎支原体。

[0114] ELISA反应结果表

[0115]

| 样本（口腔黏液） | 检测方法  | 检测结果（阳性+，阴性-） |
|----------|-------|---------------|
| 1        | ELISA | -             |
| 2        | ELISA | -             |
| 3        | ELISA | -             |
| 4        | ELISA | -             |
| 5        | ELISA | -             |
| 6        | ELISA | -             |
| 7        | ELISA | -             |

[0116]

|    |       |   |
|----|-------|---|
| 8  | ELISA | - |
| 9  | ELISA | - |
| 10 | ELISA | - |

[0117] 相关试剂生产厂家及批准文号：

[0118]

| 试剂名称                      | 生产厂家              | 批准文号                    | 备注   |
|---------------------------|-------------------|-------------------------|------|
| 猪支原体肺炎活疫苗<br>(168 株)      | 南京天邦生物科<br>技有限公司  | 兽药生字<br>[2007]100991062 | 免疫原  |
| 猪圆环病毒 2 型活疫<br>苗 (LG 株)   | 哈尔滨维科生物<br>技术开发公司 | 兽药生字<br>[2010]080011071 | 交叉试验 |
| 猪繁殖与呼吸综合征<br>疫苗 (CH-IR 株) | 普莱柯生物工程<br>股份有限公司 | 兽药生字<br>[2011]160021063 | 交叉试验 |
| 猪瘟活疫苗 (细胞源)               | 江苏南农高科技<br>股份有限公司 | 兽药生字<br>[2010]100971004 | 交叉试验 |
| 伪狂犬病活疫苗                   | 普莱柯生物工程<br>股份有限公司 | 兽药生字<br>[2009]160027018 | 交叉试验 |

[0119] 解脲支原体为使用解脲支原体条件培养基分离所得。培养基为陕西瑞凯生物科技有限公司生产,批准文号为:陕械注准20152400096。

[0120] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种猪支原体科特异型单克隆抗体及其在临床检测中的应用                     |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN106814186A</a>                   | 公开(公告)日 | 2017-06-09 |
| 申请号            | CN201611222068.X                               | 申请日     | 2016-12-27 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 深圳金石邦信股权投资基金管理有限公司                             |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 深圳金石邦信股权投资基金管理有限公司                             |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 深圳金石邦信股权投资基金管理有限公司                             |         |            |
| [标]发明人         | 黄威权<br>赵锋<br>吕葆真                               |         |            |
| 发明人            | 黄威权<br>赵锋<br>吕葆真                               |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/569 G01N33/577 G01N33/531               |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/56933 G01N33/531 G01N33/577             |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及兽用生物制品领域，具体公开猪支原体科特异型单克隆抗体及其在临床检测中的应用，用猪肺炎支原体做免疫原，制备了猪科支原体单克隆抗体，成功筛选到一株能稳定分泌效价高、特异性强的猪支原体科单克隆抗体杂交瘤细胞株2G2，其产生的单克隆抗体能同时和肺炎支原体及解脲脲原体发生免疫反应，并用其建立了猪支原体免疫检测试剂盒，本发明制备特异性强、效价高的猪支原体单克隆抗体，用其制备猪支原体病免疫诊断试剂盒，该试剂盒灵敏、准确、操作简便、采样无需采血，不给动物造成损害；该试剂盒能早期、快捷、准确地诊断猪支原体病；该试剂盒既能检测支原体病，也能检测解脲脲原体病，大大降低成本并提高检测效能。

| 细胞株 | 与不同抗原（疫苗）免疫反应结果（ELISA 法） |     |      |       |       |    |
|-----|--------------------------|-----|------|-------|-------|----|
|     | 蓝耳病                      | 圆环病 | 伪狂犬病 | 猪支原体  |       | 猪瘟 |
|     | 疫苗                       | 疫苗  | 疫苗   | 肺炎支原体 | 解脲脲原体 | 疫苗 |
| 1A5 | -                        | -   | -    | +     | +     | +  |
| 2G2 | -                        | -   | -    | +     | +     | -  |
| 1G6 | -                        | -   | -    | +     | +     | +  |