

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/577

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03116828.0

[43] 公开日 2004 年 7 月 21 日

[11] 公开号 CN 1514247A

[22] 申请日 2003.5.6 [21] 申请号 03116828.0

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区玉古路 20 号

[72] 发明人 吴建祥 陈正贤 李桂新

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 张法高

权利要求书 1 页 说明书 6 页

[54] 发明名称 抗钩端螺旋体的单克隆抗体及钩端螺旋体的检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种抗钩端螺旋体的单克隆抗体及钩端螺旋体的检测方法。56601 - MAbs 对钩体黄疸出血群赖型有特异性免疫反应, 56602 - MAbs 对钩体爪哇型有特异性免疫反应, 56606 - MAbs 对钩体秋季型有特异性免疫反应, 56609 - MAbs 对钩体流感伤寒群临 6 型有特异性免疫反应, 56610 - MAbs 对钩体七日热型有特异性免疫反应, 而 5 种单克隆抗体均与其他血清型的钩体没有免疫反应。本发明提供的抗 5 种致病血清型钩体的 5 种单克隆抗体, 对准确、快速分型、抗原的纯化及用于临床病人与动物钩体病的诊断均具有重要意义。本发明提供的以单抗为基础的 TAS - ELISA 检测诊断方法具有快速、方便、灵敏正确、特异性好、结果可肉眼观察等优点, 有利于其的推广应用。

1.一种抗钩端螺旋体的单克隆抗体,其特征是,56601-MAb对钩体黄疸出血群赖型有特异性免疫反应,而与其它血清型的钩体没有免疫反应;56602-MAb对钩体爪哇型有特异性免疫反应,而与其他血清型的钩体没有免疫反应;56606-MAb对钩体秋季型有特异性免疫反应,而与其他血清型的钩体没有免疫反应;56609-MAb对钩体流感伤寒群临6型有特异性免疫反应,而与其他血清型的钩体没有免疫反应;56610-MAb对钩体七日热型有特异性免疫反应,而与其他血清型的钩体没有免疫反应。

2.一种检测5种致病血清型钩端螺旋体的TAS-ELISA方法,其特征在于它的步骤为:

- 1) 抗钩体的兔抗血清 100ul/孔包被聚苯乙烯板, 37℃, 2-4h 或 4℃, 过夜;
- 2) PBST 洗涤三次后加 1-10% 的脱脂奶粉或 1-3% BSA 或 3-6% 牛血清封闭 200ul/孔于 37℃ 封闭 30-60min ;
- 3) 加入检测样品 100ul/孔。以标准血清型钩体为阳性对照, 以相应的健康样品作阴性对照, 37℃ 1-2h;
- 4) 洗涤后加用封闭液稀释的单抗腹水 100ul/孔, 37℃ 1-2h;
- 5) PBST 洗涤后加入 10000 倍稀释 HRP 标记兔抗鼠 IgG 二抗结合物 (Sigma) 100ul/孔, 37℃ 1-2h;
- 6) PBST 洗涤后加 OPD-H₂O₂ 底物于室温显色 5-30min, 2mol/L H₂SO₄ 终止反应后, 肉眼观察底物颜色变成橙黄色的孔为阳性或用 550 型酶联免疫检测仪测 492nm 的 OD 值, 以 P/N> 2.1 作为阳性判断标准。

抗钩端螺旋体的单克隆抗体及钩端螺旋体的检测方法

技术领域

本发明涉及一种抗钩端螺旋体的单克隆抗体及钩端螺旋体的检测方法。

背景技术

钩端螺旋体病是一种严重的自然疫源性急性传染病。世界各大洲均有流行，我国已有 26 个省、市、自治区发现病人或病畜及带菌动物，已查出的带菌动物有 50 多种，约有 58% 的县有本病流行。该病多发生于夏秋季节，病势急剧，感染方式和临床表现具有复杂性，临床分型包括：黄疸出血型、脑膜脑炎型、肺出血型、肾功能衰竭型和流感伤寒型。该病原不仅使人患病，对家畜的危害也很大，是一种典型的人畜共患的传染病。

钩端螺旋体病的病原为钩端螺旋体，简称钩体，该病原属钩端螺旋体属，该属分二种，一种为问号钩端螺旋体，包括所有的寄生性和致病性血清型；另一种为双曲钩端螺旋体，包括所有腐生性血清型。迄今钩体的分类仍然主要以血清学反应为准，但这一血清学方法的准确性尚不理想、在已经检定的血清型中存在着许多差异，主要问题之一是在不同的实验室抗血清的制作方法缺乏标准化。而且现在的分类技术尚不能分辨出病原体在流行病学上的关键性的差别。

钩端螺旋体从形态、和常规血清学方法很难正确判断钩体是否为致病病原，从而为该病原的检测诊断带来困难，虽然经过几十年的努力，在钩端螺旋体病的科研和防治方面已取得了一些成就，目前钩体诊断方法主要有直接暗视野显微镜检查法、改良镀银染色法、以多抗血清为基础的免疫荧光检查法、间接血凝试验、反向被动血凝试验、凝集试验及凝集素吸收试验、膨胀试验、酶联免疫吸附试验等，但有关本病的流行预测，传染源的消灭，家畜带菌的排除，早期的快速诊断方法等都有待进一步的探索，而单克隆抗体是有一个抗体产生细胞与一个骨髓瘤细胞融合而产生的杂交瘤细胞经无性繁殖而来的细胞群所产生的，所以它的免疫球蛋白属同一类别，质地纯一，而且因为它是针对单一抗原决定簇的，因此特异性强，亲和性也一致。制备针对不同致病钩体的不同单克隆抗体，并用单抗组成特异性的钩体检测方法，有利于致病钩体的分型和正确诊断，为该病的防治打下坚实的基础。

发明内容

本发明的目的是提供一种抗钩端螺旋体的单克隆抗体及钩端螺旋体的检

测方法。

抗钩端螺旋体的单克隆抗体是, 56601-MAb 对钩体黄疸出血群赖型有特异性免疫反应, 而与其它血清型的钩体没有免疫反应; 56602-MAb 对钩体爪哇型有特异性免疫反应, 而与其他血清型的钩体没有免疫反应; 56606-MAb 对钩体秋季型有特异性免疫反应, 而与其他血清型的钩体没有免疫反应; 56609-MAb 对钩体流感伤寒群临 6 型有特异性免疫反应, 而与其他血清型的钩体没有免疫反应; 56610-MAb 对钩体七日热型有特异性免疫反应, 而与其他血清型的钩体没有免疫反应。

检测 5 种致病血清型钩端螺旋体的 TAS-ELISA 方法的步骤为:

- 1) 抗钩体的兔抗血清 100ul/孔包被聚苯乙烯板, 37℃, 2-4h 或 4℃, 过夜;
- 2) PBST 洗涤三次后加 1-10% 的脱脂奶粉或 1-3% BSA 或 3-6% 牛血清封闭 200ul/孔于 37℃ 封闭 30-60min ;
- 3) 加入检测样品 100ul/孔。以标准血清型钩体为阳性对照, 以相应的健康样品作阴性对照, 37℃ 1-2h;
- 4) 洗涤后加用封闭液稀释的单抗腹水 100ul/孔, 37℃ 1-2h;
- 5) PBST 洗涤后加入 10000 倍稀释 HRP 标记兔抗鼠 IgG 二抗结合物 (Sigma) 100ul/孔, 37℃ 1-2h;
- 6) PBST 洗涤后加 OPD-H₂O₂ 底物于室温显色 5-30min, 2mol/L H₂SO₄ 终止反应后, 肉眼观察底物颜色变成橙黄色的孔为阳性或用 550 型酶联免疫检测仪测 492nm 的 OD 值, 以 P/N> 2.1 作为阳性判断标准。

由于钩端螺旋体的抗原结构复杂, 血清型又多, 用常规以多抗血清为基础的血清学方法分型复杂繁琐, 不利于本病的早期快速诊断, 用杂交瘤技术所产生的抗钩体的单克隆抗体, 能特异、快速地对钩体血清型进行鉴定。因此本发明提供的抗 5 种致病血清型钩体的 5 种单克隆抗体, 对准确、快速分型、抗原的纯化及用于临床病人与动物钩体病的诊断均具有重要意义。本发明还提供一种可特异检测 5 种致病血清型钩体的灵敏、快速正确的诊断检测方法, 即 TAS-ELISA 检测方法。目前钩体诊断方法虽然均取得了一定的效果, 但这些方法均有不足之处, 有的阳性检出率不高, 灵敏度低; 有的操作技术复杂; 有的需一定设备条件; 有的判断结果需有一定经验, 并受菌量、时间因素的限制; 有的特异性不高, 假阳性率高, 结果不正确, 且多数方法费时费力。而本发明提供的以单抗为基础的 TAS-ELISA 检测诊断方法具有快速、方便、灵敏正确、特异性好、结果可肉眼观察等优点, 有利于其的推广应用。

具体实施方式

钩端螺旋体是一种重要的人畜共患的病原菌。在自然界人和 50 多种动物都为其宿主或寄主，是严重危害人畜安全的自然疫源病原之一。目前钩体病总体发病率及死亡率均已显著下降，但许多地区流行因素依然存在，稍有疏忽，就可能引起该病爆发流行。

目前致病钩体分型和检测诊断的常规方法均存在不足之处，而单抗具有特异性、均质性、稳定性、能大量生产、能正确分型和检测等优点，因此开展致病钩体的单抗和以单抗为中心组合成正确、快速的检测方法研究具有重要意义。

本发明制备分别抗 5 种致病血清型钩体的 5 种单抗及相应的检测诊断方法。我们用灭活的这 5 种血清型钩体制备出抗相应血清型钩体的单抗，并建立了相应正确、灵敏、快速、方便的 TAS-ELISA 方法，从而为钩体病的防治打下基础。

一. 克隆抗体的制备

1. 免疫原的制备

钩体黄疸出血群赖型菌株、爪哇型菌株、秋季型菌株、流感伤寒群临 6 型菌株、七日热型菌株的活钩体在 8% 兔血清改良 Korthof 培养基 30℃ 培养 3—4 周，将这些培养物经 2% 甲醛溶液灭活 48 小时，12000rpm 离心 10 分钟。沉淀用灭菌 0.01mol/L PBS pH7.2 离心洗涤三次，最后用少量灭菌 PBS 溶解沉淀备用。

2. 免疫动物

选择体重 18—20g BALB/C 雌性小鼠，分别用钩体赖型、爪哇型、秋季型、临 6 型、七日热型菌的制备抗原免疫。在 400 倍暗视野下镜检，将每视野达 100 个菌体的以上者各取 1ml 与等体积福氏完全佐剂混合，充分乳化后，经背腹部皮下多点注射 0.5ml 每只，间隔 3 周，取与一免等量抗原和等体积的福氏不完全佐剂充分乳化后，第二次皮下多点注射 0.5ml 每只，过 3 周后用加倍剂量的抗原进行腹腔注射，3 天后取脾细胞进行融合。

3. 细胞融合

取上述免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 按 5-10: 1 的比例，在无血清的 RPMI-1640 (Gibco) 培养基中混匀，1500rpm 离心 5min，去除培养基，用分子量为 3350 的 50%PEG (Sigma) 作为融合剂，在 37℃ 下水浴下加入 0.5-0.7ml，使其融合 2min，用无血清的 RPMI-1640 培养基终止融合后 1500rpm 离心 5min，沉淀用 HAT 培养基悬浮，分装到 96 孔含有饲养细胞的细胞板中，37℃，5%CO₂ 的细胞培养器皿中培养。

4. 杂交瘤细胞及阳性孔的筛选

细胞培养器皿中培养 5 天后, 用 HAT 培养基换液一次, 第 10 天用 HT 培养基换液, 等到融合细胞覆盖孔底 10%-50%时, 常规间接 ELISA 方法筛选阳性孔, 共获 50 多个对上述 5 种血清型钩体有反应的阳性孔。

5. 阳性孔的特异性检测及特异性阳性孔的克隆

阳性孔的特异性鉴定采用间接 ELISA 方法, 具体为福尔马林灭活的用包被液稀释成 1—30ug/mL 的不同血清型钩体 50ul/孔包被 ELISA 板, 37℃过夜, 使其全部干燥后, 吸附于聚苯乙烯板孔; PBST 洗涤三次后用 1—10%的脱脂奶粉或 1—3%BSA 或 3—6%牛血清封闭 30-60min; 加入阳性孔培养上清 50ul/孔, 37℃ 1—2 小时; PBST 洗涤三次后加入按说明书稀释 10000 倍的辣根过氧化物酶标记兔抗鼠 IgG 二抗 (Sigma 公司) 50ul/孔, 37℃ 1—2 小时, PBST 洗涤四次后, 用 OPD-H₂O₂ 底物显色, 2mol/L H₂SO₄ 终止反应后, 用酶标仪读取 OD₄₉₂ 的值, 以与阴性 OD 值比值大于 2.1 为阳性。获分别对上述 5 种血清型钩体有特异性反应的阳性孔各一个。筛选出的特异性阳性孔用常规的有限稀释法克隆, 获分别对上述 5 种血清型钩体有特异性反应的杂交瘤细胞株各一株。细胞株进一步扩大培养, 用于制备单抗腹水和液氮冻存。

6. 单克隆抗体腹水制备及纯化

取 8 周龄左右 BALB/C 小鼠, 腹腔注射 0.3-0.5ml 降植烷 (Sigma), 7-10 天后腹腔注入 5-10×10⁵ 个杂交瘤细胞, 注射后 7-10 天可见小鼠腹部明显膨大, 采取腹水, 2000rpm 离心 3min, 收集上清液, 即为单克隆抗体腹水。取 1 倍体积腹水加 2 倍体积 0.06M PH4.8 醋酸缓冲液稀释, 加辛酸 (30ul/ml 腹水), 室温下边加边搅拌, 4℃澄清 1 小时, 12000rpm 离心 20min, 收集上清, 再用 50%饱和硫酸铵沉淀免疫球蛋白, 4℃放置 2 小时, 3000rpm 离心 20min, 沉淀用 2 倍体积的 PBS 溶液溶解, 在 4℃流动透析 24 小时后即获纯化的腹水抗体, -70℃保存。

7. 单克隆抗体的亚类鉴定和腹水效价测定

将单抗腹水与 Sigma 公司的标准抗 BALB/C 小鼠 IgG, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM 抗体, 作双向琼脂扩散试验, 结果为, 56601-MAb 亚类为 IgG₁, 56602-MAb 为 IgG₃, 56606-MAb 为 IgG₁, 56609-MAb 为 IgG₁, 56610-MAb 为 IgG_{2a}。用常规间接 ELISA 方法检测单抗腹水效价, 结果为上述 5 株腹水效价均在 10⁻⁶—10⁻⁷ 之间。

一. 一种检测钩端螺旋体的 TAS-ELISA 方法的建立

1. TAS-ELISA 方法的操作流程:

1) 抗钩体的兔抗血清 (本所自制) 100ul/孔包被聚苯乙烯板, 37℃, 2-4h

或 4℃，过夜；

2) PBST 洗涤三次后加 1—10% 的脱脂奶粉或 1—3% BSA 或 3—6% 牛血清封闭 200ul/孔于 37℃ 封闭 30—60min；

3) 加入检测样品 100ul/孔。以标准血清型钩体为阳性对照，以相应的健康样品作阴性对照，37℃ 1—2h；

4) 洗涤后用封闭液稀释的单抗腹水 100ul/孔，37℃ 1—2h；

5) PBST 洗涤后加入 10000 倍稀释 HRP 标记兔抗鼠 IgG 二抗结合物 (Sigma) 100ul/孔，37℃ 1—2h；

6) PBST 洗涤后加 OPD-H₂O₂ 底物于室温显色 5—30min，2mol/L H₂SO₄ 终止反应后，肉眼观察底物颜色变成橙黄色的孔为阳性或用 550 型酶联免疫检测仪测 492nm 的 OD 值，以 P/N > 2.1 作为阳性判断标准。

2. TAS-ELISA 检测方法最适条件的确定：

采用 TAS-ELISA 方阵试验进行，即横向加兔抗标准血清型钩体血清（本所自制）用包被缓冲液从 1 : 100 至 1 : 102400 倍比稀释；固定各种标准血清型钩体 2ug/ml；纵向加用 PBST 缓冲液从 1 : 5 至 1 : 2048000 倍比稀释单抗腹水；HRP 标记的兔抗鼠 IgG 二抗按 Sigma 公司说明书稀释，1 : 10000 倍；按 TAS-ELISA 方法流程进行操作。结果为 5 个标准血清型的兔抗血清最适稀释度均为 1 : 3000；56601-MAb，56602-MAb，56606-MAb，56609-MAb，56610-MAb 的最适稀释度分别为 1 : 5000，1 : 8000，1 : 4000，1 : 10000，1 : 5000。

3. TAS-ELISA 方法检测灵敏度的确定

在兔抗血清和单抗腹水最适工作浓度下，将 10ug/ml 的标准血清型钩体用含 1-3% BSA PBST 倍比稀释后进行 TAS-ELISA 测定，结果为：TAS-ELISA 检测 5 种血清型钩体的灵敏度均在 0.1—1ng 以上，说明本方法具有很好的灵敏度。

4. TAS-ELISA 方法的特异性确定

用适当稀释的各种血清型钩体作为抗原，在最适抗血清和单抗腹水工作浓度下进行 TAS-ELISA 试验，结果为：由 56601-MAb 组合成的 TAS-ELISA 方法只对赖型钩体有特异性免疫反应，而与其它血清型的钩体没有免疫反应；由 56602-MAb 组合成的 TAS-ELISA 方法对钩体爪哇型有特异性免疫反应，而与其他血清型的钩体没有免疫反应；由 56606-MAb 组合成的 TAS-ELISA 方法对钩体秋季型有特异性免疫反应，而与其他血清型的钩体没有免疫反应；由 56609-MAb 组合成的 TAS-ELISA 方法对钩体流感伤寒群临 6 型有特异性免疫反应，而与其他血清型的钩体没有免疫反应；由 56610-MAb 组合成的

TAS-ELISA 方法对钩体七日热型有特异性免疫反应，而与其他血清型的钩体没有免疫反应。说明用 **TAS-ELISA** 方法检测致病钩体具有很好的特异性。

专利名称(译)	抗钩端螺旋体的单克隆抗体及钩端螺旋体的检测方法		
公开(公告)号	CN1514247A	公开(公告)日	2004-07-21
申请号	CN03116828.0	申请日	2003-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	吴建祥 陈正贤 李桂新		
发明人	吴建祥 陈正贤 李桂新		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗钩端螺旋体的单克隆抗体及钩端螺旋体的检测方法。56601 - MAb对钩体黄疸出血群赖型有特异性免疫反应，56602 - MAb对钩体爪哇型有特异性免疫反应，56606 - MAb对钩体秋季型有特异性免疫反应，56609 - MAb对钩体流感伤寒群临6型有特异性免疫反应，56610 - MAb对钩体七日热型有特异性免疫反应，而5种单克隆抗体均与其他血清型的钩体没有免疫反应。本发明提供的抗5种致病血清型钩体的5种单克隆抗体，对准确、快速分型、抗原的纯化及用于临床病人与动物钩体病的诊断均具有重要意义。本发明提供的以单抗为基础的TAS - ELISA检测诊断方法具有快速、方便、灵敏正确、特异性好、结果可肉眼观察等优点，有利于其的推广应用。