



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109507421 A

(43)申请公布日 2019.03.22

---

(21)申请号 201811495602.3

(22)申请日 2018.12.07

(83)生物保藏信息

CCTCC NO: C 2018236 2018.11.08

(71)申请人 广西大学

地址 530003 广西壮族自治区南宁市西乡塘区大学东路100号

(72)发明人 吴文德 张为宇 侯林静

(74)专利代理机构 北京天奇智新知识产权代理有限公司 11340

代理人 韦莎

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

---

(54)发明名称

抗水牛IgG单克隆抗体细胞株及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了抗水牛IgG单克隆抗体细胞株及其制备方法和应用。本发明采用自主制备得到的抗水牛IgG单克隆抗体2G7建立检测水牛大片吸虫抗体的ELISA方法,可大量地对水牛进行快速准确的检测大片形吸虫病,对水牛实时情况进行检测,在预防或及时发现已患病的水牛的情况下有重要作用,能极大地加强水牛大片吸虫的防控力度。

1. 一种抗水牛IgG单克隆抗体细胞株,其特征在于:所述细胞株为杂交瘤细胞株2G7,保藏号为CCTCC NO:C2018236。

2. 如权利要求1所述的抗水牛IgG单克隆抗体细胞株的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1、血清提取:采用正辛酸-饱和硫酸铵法提取纯化水牛IgG;

S2、小鼠免疫:用纯化后的水牛IgG、佛氏完全佐剂、佛氏不完全佐剂免疫小鼠;

S3、细胞融合判定:在三次免疫后一周,对小鼠剪尾采血,用间接ELISA法检测小鼠血清效价,判定OD<sub>450</sub>值是阳性后,则可进行细胞融合;

S4、细胞融合:取可进行细胞融合的小鼠的脾细胞进行培养后,将骨髓瘤细胞和脾细胞混合均匀,离心后弃去上清液,加入细胞融合剂,室温静置,加入DMEM,静置后离心,弃去上清液,加入HAT重悬后,装入细胞培养板,置于37℃含5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养,得到杂交瘤细胞;

S5、阳性瘤细胞的筛选及克隆化培养:采用间接ELISA法对融合后的杂交瘤细胞做至少三次筛查,得到阳性杂交瘤细胞株即抗水牛IgG单克隆抗体细胞株,将阳性杂交瘤细胞株继续扩大培养,进行再克隆,筛查3-4次后,将阳性克隆率达100%的杂交瘤细胞株冻存,先把装有杂交瘤细胞株的冻存管置于4℃2个小时,再置于-20℃2个小时,然后置于-80℃24小时以上,再转到液氮罐进行长期保存。

3. 如权利要求2所述的抗水牛IgG单克隆抗体细胞株的制备方法,其特征在于:步骤S2中,用乳化好的乳剂免疫6周龄的BALB/c小鼠,具体步骤如下:

(1) 初次免疫:用120μg抗原即水牛IgG+佛氏完全佐剂,于腋窝、背部皮下、腹股沟多部位多点注射;

(2) 第二次免疫,于2周后进行:用320μg水牛IgG+等量佛氏不完全佐剂,于腋窝、背部皮下、腹股沟多部位多点注射;

(3) 第三次免疫,于3周后进行:同步骤(2);

(4) 第四次免疫,于细胞融合前3天进行:在小鼠的腹腔或脾脏注射100μg水牛IgG。

4. 如权利要求2所述的抗水牛IgG单克隆抗体细胞株的制备方法,其特征在于:步骤S4中,所述骨髓瘤细胞、脾细胞、细胞融合剂、DMEM在混合前均预热至37℃。

5. 权利要求1所述的抗水牛IgG单克隆抗体细胞株在检测水牛大片形吸虫抗体中的应用。

6. 一种检测水牛大片形吸虫抗体的方法,其特征在于:利用权利要求1所述的杂交瘤细胞株2G7分泌的单克隆抗体作为第一抗体,利用羊抗鼠酶标二抗作为第二抗体,建立间接ELISA法,用建立的ELISA法对水牛血清进行大片形吸虫抗体检测。

7. 如权利要求6所述的检测水牛大片形吸虫抗体的方法,其特征在于:所述间接ELISA法的反应条件为:抗原包被浓度为5μg • ml<sup>-1</sup>,一抗2G7稀释浓度为1:5000,二抗羊抗鼠稀释浓度为1:5000,血清稀释度为1:400。

## 抗水牛IgG单克隆抗体细胞株及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及牛疫病检测技术领域,具体涉及抗水牛IgG单克隆抗体细胞株及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 片形吸虫 (*Fasciola* spp) 病是感染牛羊等反刍动物最重要的寄生虫病之一,同时也是一种食源性人畜共患寄生虫病。寄生在牛肝脏胆管中的大片形吸虫,能引起急性或慢性的肝炎和胆管炎,并继发全身性的中毒和营养障碍,常引起犊牛的大批死亡。牛的片形吸虫病多呈慢性,临床症状根据感染强度和牛的年龄、饲养管理条件、抵抗力等因素不同而有轻重不同表现。在轻度感染时,除了牛犊(1.5~2岁)有症状表现外,患畜常不表现症状,这使得此病在成年牛群中不易被发觉。但成年牛如果群体大量感染并且存在患畜体质较差的情况,也会出现强烈明显的症状,甚至引起死亡。

[0003] 在我国,大片吸虫极大地危害畜牧产业的正常发展,其中华南地区以及华东地区的感染率最为严重,涵盖了湖南、湖北、江苏、江西、广西、以及福建等地区。广西是我国的水牛之乡,作为水牛养殖第一大省,广西地区的水牛数量多达近500万头,受到水牛片形吸虫的感染现况也十分严重。因此,能够准确及时地检测到大片形吸虫病,不仅在提高生产性能、保护牲畜健康、减少经济损失等方面意义重大,也对保护人类健康意义深远。

[0004] 目前针对水牛大片形吸虫病的检测问题,应用方法主要有聚合酶链式反应(PCR)、虫卵检测法等,但这些检测方法普遍都存在设备、专业知识要求高等问题,在推广方面有很大的局限性。水牛大片形吸虫病对我国水牛养殖业产生了很大的危害,进行防治的手段应该以预防为主,治疗为辅,因此,建立一种快速、方便、易于推广的大片吸虫感染检测方法非常必要。

### 发明内容

[0005] 本发明提供抗水牛IgG单克隆抗体细胞株及其制备方法和应用,采用自主制备得到的抗水牛IgG单克隆抗体2G7建立检测水牛大片吸虫的ELISA方法,可大量地对水牛进行快速准确的检测大片形吸虫病,对水牛实时情况进行检测,在预防或及时发现已患病的水牛的情况中有重要作用,能极大地加强水牛大片吸虫的防控力度。

[0006] 本发明采用的技术方案如下:

[0007] 一种抗水牛IgG单克隆抗体细胞株,所述细胞株为杂交瘤细胞株2G7,保藏号为CCTCCNO:C2018236。

[0008] 所述的抗水牛IgG单克隆抗体细胞株的制备方法,包括如下步骤:

[0009] S1、血清提取:采用正辛酸-饱和硫酸铵法提取纯化水牛血清IgG;

[0010] S2、小鼠免疫:用纯化后的水牛IgG、佛氏完全佐剂、佛氏不完全佐剂免疫BALB/c小鼠;

[0011] S3、细胞融合判定:在三次免疫后一周,对小鼠剪尾采血,用间接ELSA法检测小鼠

血清效价,判定OD<sub>450</sub>值是阳性后,则可进行细胞融合;

[0012] S4、细胞融合:取可进行细胞融合的小鼠的脾细胞进行培养后,将骨髓瘤细胞和脾细胞混合均匀,离心后弃去上清液,加入细胞融合剂,室温静置,加入DMEM,静置后离心,弃去上清液,加入HAT重悬后,装入细胞培养板,置于37℃含5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养,得到杂交瘤细胞;

[0013] S5、阳性瘤细胞的筛选及克隆化培养:采用间接ELISA法对融合后的杂交瘤细胞做至少三次筛查,得到阳性杂交瘤细胞株2G7即抗水牛IgG单克隆抗体细胞株,将阳性杂交瘤细胞株2G7继续扩大培养,进行再克隆,筛查3-4次后,将阳性克隆率达100%的杂交瘤细胞株2G7冻存,先把装有杂交瘤细胞株2G7的冻存管置于4℃2个小时,再置于-20℃2个小时,最后置于-80℃24小时以上,再转到液氮罐进行长期保存。

[0014] 进一步的,步骤S2中,用乳化好的乳剂免疫6周龄的BALB/c小鼠,具体步骤如下:

[0015] (1) 初次免疫:用120μg抗原即水牛IgG+等量佛氏完全佐剂,于腋窝、背部皮下、腹股沟多部位多点注射;

[0016] (2) 第二次免疫,于2周后进行:用320μg水牛IgG+等量佛氏不完全佐剂,于腋窝、背部皮下、腹股沟多部位多点注射;

[0017] (3) 第三次免疫,于3周后进行:同步骤(2);

[0018] (4) 第四次免疫,于细胞融合前3天进行:在小鼠的腹腔或脾脏注射100μg水牛IgG。

[0019] 进一步的,步骤S4中,所述骨髓瘤细胞、脾细胞、细胞融合剂、DMEM在混合前均预热至37℃。

[0020] 本发明还提供所述的抗水牛IgG单克隆抗体细胞株在检测水牛大片形吸虫抗体中的应用。

[0021] 本发明还提供一种检测水牛大片形吸虫抗体的方法,是利用杂交瘤细胞株2G7分泌的单克隆抗体作为第一抗体,利用羊抗鼠酶标二抗作为第二抗体,建立间接ELISA法,用建立的ELISA法对水牛血清进行大片形吸虫抗体检测。

[0022] 作为优选,所述间接ELISA法的反应条件为:抗原包被浓度为5μg • ml<sup>-1</sup>,一抗2G7稀释浓度为1:5000,二抗羊抗鼠稀释浓度为1:5000,血清稀释度为1:400。

[0023] 生物材料保藏信息说明:本发明所述的杂交瘤细胞株2G7,保藏号为CCTCC NO:C 2018236,已于2018年11月8日保藏于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection,简称CCTCC),地址:湖北省武汉市武昌区八一路299号武汉大学校内。

[0024] 有益效果:

[0025] 1、目前抗牛IgG单克隆抗体的制备方面研究较少,姜天童发表过一篇名为《抗牛IgG单克隆抗体的制备及其特性》的文章,他成功制备了抗牛IgG单克隆抗体,但其所用的方法比较繁琐,后期也没有进行冻存和复苏,只是对抗牛IgG单克隆抗体进行了特性分析,使得该杂交瘤细胞株的生长稳定性不为人知。本发明成功制备出了抗水牛IgG单克隆抗体,其具有良好的特异性,本发明还对其进行了解冻和复苏,保证了其稳定性,为建立诊断和监测水牛病的方法和进一步分析水牛IgG表面抗原功能奠定基础;为流行病学调查、免疫检测等提供一个特异的、可靠的方法奠定基础;并且可作为一项重要而灵敏的免疫学检测、血清学诊断试品。

[0026] 2、本发明利用自主制备的抗水牛IgG单克隆抗体2G7建立检测水牛大片吸虫抗体

的ELISA方法,建立的间接EILSA法检测大片吸虫抗体非常方便,采集全血分离血清即可用于检测。该方法可以大量地对水牛进行较为快速准确的检测,对水牛实时情况进行检测,在预防或及时发现已患病的水牛的情况中有重要作用,极大地加强了水牛大片吸虫的防控力度。此方法可应用在快速地诊断大片吸虫中,同时也能应用在流行病学的调查中。本发明的大片吸虫间接EILSA方法的构建,为综合防治大片吸虫病提供了一种便捷化的方式。

## 具体实施方式

- [0027] 下面结合具体的实施例对本发明作进一步说明。
- [0028] 实施例
- [0029] 抗水牛IgG单克隆抗体的制备
- [0030] 实验材料
- [0031] SP2/0-Ag 14骨髓瘤细胞,来自广西大学动物科学技术学院寄生虫教研室。
- [0032] 6-8周龄的BALB/c雌性小鼠,清洁级,三只,来自广西医科大学实验动物中心。
- [0033] 1.部分试剂的配制
- [0034] 1.1正辛酸-饱和硫酸铵法的相关试剂配制
- [0035] (1)含氯化钾2.6mM,氯化钠137mM,EDTA 0.2mM的pH 7.4磷酸盐缓冲液:称取2.61g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,28.94g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O,8.0g氯化钠,0.06g EDTA,0.2g氯化钾,加蒸馏水至1000mL;
- [0036] (2)5M氢氧化钠:称取20g氢氧化钠粉末溶于少量三蒸水,再加三蒸水定容至100ml;
- [0037] (3)0.2M pH=7.4的PB缓冲液
- [0038] ①20.2mol/L的磷酸二氢钠:称取71.632g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O溶于少量三蒸水,再加三蒸水定容至1000mL;
- [0039] ②0.2mol/L的磷酸二氢钠:称取27.6g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O溶于少量三蒸水,再加三蒸水定容至1000mL;
- [0040] ③0.2M pH=7.4的PB缓冲液:取81mL 0.2mol/L的①和19mL 0.2mol/L的②充分混匀。
- [0041] (4)饱和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液:往80℃的三蒸水里加入(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>粉末,直到粉末不溶解,放入4℃冰箱过夜,晶体析出后取上清液备用。
- [0042] (5)0.06M pH=4.8醋酸缓冲液
- [0043] 贮存液:A液,0.06M NaAc:称取0.492g无水NaAc溶于少量三蒸水,再加三蒸水定容至100mL;B液,HAc:344uL的冰醋酸加三蒸水定容至100mL;
- [0044] 应用液:取59mL A液和41mL B液混合均匀,用5M NaOH把pH调到4.8。
- [0045] 1.2 ELISA试剂的配制
- [0046] 包被缓冲液:称取1.59g碳酸钠,2.93g碳酸氢钠,加少量三蒸水充分溶解,再加三蒸水定容到1000mL,高压灭菌后4℃保存。
- [0047] 稀释缓冲液(PBS):按说明取PBS粉末,加少量三蒸水充分溶解,再加三蒸水定容,高压灭菌后4℃保存。
- [0048] 封闭液(5%脱脂奶粉):脱脂奶粉3.0g,加0.01M PBS定容至60mL。
- [0049] 洗涤缓冲液(PBST):1L 0.01M PBS (pH7.2-7.4) 加1mL Tween-20充分混匀备用。

[0050] 底物缓冲液:取9.3g柠檬酸,36.8g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O,加少量三蒸水充分溶解,再加三蒸水定容,高压灭菌后4℃保存。

[0051] 显色液(11mL):10mL底物缓冲液,32μL 0.75%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,1mL TMB混匀(即用即配)。

[0052] 终止液(2M浓硫酸):取98%浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.43mL,缓慢加入到44.57mL三蒸水中,混合均匀。

[0053] 1.3细胞融合试剂的配制

[0054] ①次黄嘌呤和胸腺嘧啶核昔(HT)贮存液(100×):

[0055] 称取136.1mg次黄嘌呤和38.8mg胸腺嘧啶核昔,加三蒸水至100mL,于45-50℃水浴中使溶解完全,过滤除菌,分装EP管(2mL/支),-20℃冻存。

[0056] ②丙酮酸钠溶液(0.1mol/L):

[0057] 称取1.10g丙酮酸钠,加入少量三蒸水充分溶解,再加入三蒸水定容至100mL,用微孔滤膜(0.22μm)过滤除菌,分装EP管(1mL/支),-20℃保存。

[0058] ③L-谷氨酰胺(L.G.)溶液(0.2mol/L):

[0059] 称取2.92g L-谷氨酰胺,用100mL三蒸水溶解,过滤除菌,分装EP管(2mL/支),-20℃冻存。

[0060] ④HEPES溶液(1mol/L):

[0061] 称取HEPES 23.83g,加入少量三蒸水充分溶解,再加三蒸水定容至100mL,过滤除菌,分装小瓶(4mL/瓶),4℃保存备用。

[0062] ⑤氨基喋呤(A)贮存液:

[0063] 称取氨基喋呤1.76mg,溶于90mL三蒸水中,滴加0.5mL 1mol/L的NaOH中和,再补加三蒸水至100mL。过滤除菌,分装EP管(2mL/支),-20℃保存。

[0064] ⑥细胞融合剂:购自美国基因公司。

[0065] ⑦8-氮鸟嘌呤贮存液:

[0066] 称取200mg 8-氮鸟嘌呤,先加入1mL 4mol/L的NaOH,等充分溶解以后再加三蒸水定容到100mL,过滤除菌;分装小瓶,-20℃冻存备用。

[0067] ⑧7.5%碳酸氢钠溶液:

[0068] 称取7.5g分析纯碳酸氢钠,溶于100mL三蒸水中,过滤除菌,分装小瓶(5mL/瓶),盖紧瓶塞,4℃保存。

[0069] ⑨双抗溶液(100×):

[0070] 取链霉素、青霉素各100万单位,加入少量三蒸水充分溶解,再加三蒸水定容至100mL,分装小瓶(5mL/瓶),-20℃冻存。

[0071] ⑩HT培养液(100mL):

[0072] 取丙酮酸钠溶液、200mM L谷氨酰胺、7.5%NaHCO<sub>3</sub>溶液、HEPES溶液(1mol/L)、HT贮存液、双抗各1mL,胎牛血清20mL,DMEM培养基74mL,充分混合。

[0073] ⑪DMEM完全培养液(100mL):

[0074] 取丙酮酸钠溶液、双抗、200mM L谷氨酰胺、7.5%NaHCO<sub>3</sub>溶液、HEPES溶液(1mol/L)各1mL,DMEM培养基85mL,胎牛血清10mL,充分混合。配好后过滤除菌(0.22μm),分装,4℃保存。

[0075] ⑫HAT选择培养液(100mL):

- [0076] 含丙酮酸钠溶液、HEPES溶液(1mol/L)、HT贮存液、A储备液、7.5%NaHCO<sub>3</sub>溶液、200mM L-谷氨酰胺、双抗(10000IU/mL)各1mL,胎牛血清20mL,DMEM培养基73mL,充分混合。
- [0077] ⑬细胞冻存液(100mL):
- [0078] 胎牛血清20mL,DMEM培养基70mL,DMSO(二甲基亚砜)10mL。
- [0079] 2.抗水牛IgG单克隆抗体的制备
- [0080] 2.1水牛血清IgG的提取纯化
- [0081] (1)把水牛血清于4℃1000rpm离心15min;
- [0082] (2)将0.06mol/L pH=5.0的醋酸缓冲液和水牛血清按2:1体积比混合,再用1mol/L HCl把pH调到4.8;
- [0083] (3)向稀释好的血清中以1:11的体积比逐滴加入正辛酸,边加入边搅拌,要30分钟内加完;
- [0084] (4)4℃静置2小时后,2℃15000rpm离心30分钟,丢弃沉淀;
- [0085] (5)用定性滤纸过滤上清液之后,按1:10体积比加入0.01mol/L PBS(用1mol/L NaOH把pH调到7.2);
- [0086] (6)在4℃下边搅拌边缓慢加入等体积的饱和硫酸铵,作用30min,静置1小时;
- [0087] (7)10000r/min离心30min后去掉上清;
- [0088] (8)沉淀溶于适量PBS(含2.6mol/L氯化钾,137mmol/L氯化钠,0.2mmol/L EDTA)中,于50~100倍体积的上述PBS中透析,每4h换一次液,其间换液3次以上;
- [0089] (9)取出10000r/min离心30min,除去不溶性沉渣;
- [0090] (10)取少量透析液适当稀释,用BCA蛋白浓度试剂盒子测定蛋白质含量后,分装,-20℃冻存备用。
- [0091] 2.2抗原乳化和动物免疫
- [0092] 2.2.1抗原乳化
- [0093] (1)将等量抗原(水牛IgG)和佐剂装于EP管中,先用移液器反复吹吸五六次,再采用实验室的仪器进行超声波乳化;
- [0094] (2)乳化结果检查:用注射器吸取少量乳化后的抗原置于冰水中,如果成滴且保持完整不扩散,说明乳化成功了;如果扩散,则再乳化。
- [0095] 2.2.2动物免疫
- [0096] 用乳化好的乳剂免疫6周龄的BALB/c小鼠。
- [0097] (1)初次免疫:用抗原(水牛IgG)120μg+等量佛氏完全佐剂(充分乳化),腋窝、背部皮下、腹股沟多部位多点注射。
- [0098] (2)第二次免疫(2周后):抗原(水牛IgG)320μg+等量佛氏不完全佐剂,腋窝、背部皮下、腹股沟多部位多点注射。
- [0099] (3)第三次免疫(3周后):抗原(水牛IgG)320μg+等量佛氏不完全佐剂,腋窝、背部皮下、腹股沟多部位多点注射。
- [0100] (4)第四次免疫(融合前3天),①、②号小鼠腹腔注射100μg抗原(水牛IgG),③号小鼠脾脏注射100μg抗原(水牛IgG)。
- [0101] 以上抗原均为水牛血清IgG经提取纯化后的水牛IgG。
- [0102] 免疫受物种不同,细胞类别不同,作用部位不同等各种因素的影响,每种抗原的免

疫程序都有所不同,因此要根据抗原自身特点来制定特定的免疫方案,才能获得理想抗体,达到事半功倍的效果,没有任何一个免疫程序是通用的。本发明中采用了皮下、腹腔、腹股沟等多部位多点注射,最后还进行了一次加强免疫(第四次免疫),用腹腔注射和脾脏注射方法,取得较好效果。

[0103] 2.3间接ELISA检测方法的建立

[0104] (1) 将水牛血清和IgG(用包被缓冲液稀释成10、15、20 $\mu$ g/mL)加入酶标板孔中,50 $\mu$ L/孔;

[0105] (2) 37℃培养2h,洗涤3次;

[0106] (3) 用5%脱脂奶粉(200 $\mu$ L/孔)进行封闭,置于37℃湿盒中2h;

[0107] (4) 洗板:用洗涤缓冲液(PBST)洗3次,5min/次;

[0108] (5) 将免疫的小鼠血清100 $\mu$ L/孔(已按1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000做倍比稀释),设阴性、阳性对照孔,置于37℃湿盒中1h;

[0109] (6) 洗板后按100 $\mu$ L/孔加入已按1:5000倍稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG,置于37℃温箱中1h;

[0110] (7) 洗板后加100 $\mu$ L/孔现配现用的显色液,置37℃培养箱显色20min(避光);

[0111] (8) 终止反应:按50 $\mu$ L/孔加入2M浓硫酸终止液;

[0112] (9) 用酶标仪读取OD<sub>450</sub>值,据阴阳临界值判定结果(阴阳临界值的确定:在对照条件成立的情况下,阴阳临界值为阴性血清OD<sub>450</sub>平均值×2.1。远大于该值判定为阳性;远小于判为阴性;接近则为弱阳性)。

[0113] 本发明通过间接ELISA法来确定小鼠血清的稀释度和水牛IgG的包被浓度,水牛IgG稀释为0.3 $\mu$ g/mL,小鼠血清稀释为50倍。如表1所示,阳性效价在1.0左右,阴性OD<sub>450</sub>值0.15左右,空白对照在0.1左右。

[0114] 表1ELISA最终优化结果

[0115]

血清稀释倍数	水牛血清稀释50倍			水牛IgG(0.3 $\mu$ g/mL)		
	1号	3号	阴性	1号	3号	阴性
1×10 <sup>3</sup>	1.387	1.811	0.192	1.338	1.680	0.151
2×10 <sup>3</sup>	0.821	1.003	0.131	0.927	1.091	0.148
4×10 <sup>3</sup>	0.407	0.620	0.116	0.610	0.684	0.232
8×10 <sup>3</sup>	0.291	0.365	0.099	0.335	0.477	0.136
16×10 <sup>3</sup>	0.155	0.289	0.085	0.281	0.700	0.159
32×10 <sup>3</sup>	0.110	0.166	0.091	0.150	0.382	0.130
64×10 <sup>3</sup>	0.124	0.103	0.056	0.121	0.260	0.125
空白值	0.078	0.069	0.070	0.077	0.071	0.080

[0116] 2.4小鼠抗体血清的效价测定

[0117] 第三次免疫结束后一周,将免疫完的小鼠剪尾,采集血液,用“2.3”优化的间接ELISA法检测小鼠血清效价,同时采集一只没有接受免疫的健康小鼠的血液作为阴性对照。阳性血清稀释到16×10<sup>3</sup>时,OD<sub>450</sub>的值依然是阳性,而且阴性数据也比较低,则可以进行融合。本实施例一共做了两次融合,血清效价的检测结果如表2所示。

[0118] 表2小鼠血清效价检测

[0119]

血清稀释倍数	1号	2号	3号	阴性
$1 \times 10^3$	1.450	0.811	1.770	0.174
$2 \times 10^3$	0.720	0.400	1.031	0.129
$4 \times 10^3$	0.481	0.251	0.689	0.155
$8 \times 10^3$	0.299	0.174	0.397	0.099
$16 \times 10^3$	0.164	0.113	0.292	0.090
$32 \times 10^3$	0.101	0.090	0.158	0.052
$64 \times 10^3$	0.120	0.109	0.165	0.121
空白值	0.079	0.089	0.081	0.088

- [0120] 2.5细胞融合
- [0121] 2.5.1骨髓瘤细胞的准备
- [0122] (1) 于融合前3~4d,将骨髓细胞复苏,传代培养,调整细胞状态;
- [0123] (2) 融合前的2天对细胞进行扩大培养,把细胞的生长状态调整到最好;
- [0124] (3) 在融合前的8~20h之内,用含20%FBS的DMEM培养基给细胞换液;
- [0125] (4) 选择长得最好并且处于生长对数期的细胞收集到离心管里,在室温下1000rpm离心10min左右;
- [0126] (5) 收集沉淀,用10mL DMEM重悬;
- [0127] (6) 调整细胞浓度至 $10^6$ 个/mL,密封好,置于37℃恒温水浴中备用。
- [0128] 2.5.2脾细胞的制备
- [0129] (1) 选择加强免疫后3~4d,效价良好的小鼠,眼球采血(作阳性对照),然后断掉颈椎使其死亡;
- [0130] (2) 将死亡的小鼠放到准备好的75%酒精中,进行消毒5min。
- [0131] (3) 在超净工作台,用经过高温煮沸过的消毒器械,剪开小鼠的皮肤和腹膜,打开小鼠的腹腔,取出小鼠的脾脏(确保无菌操作);
- [0132] (4) 将小鼠脾脏放入10mL DMEM中洗一次,小心剥掉脂肪及结缔组织,再放到另外10mL DMEM培养基中,用注射器的内芯轻轻反复挤压脾脏,再用移液器吹打几次,使脾细胞充分分离;
- [0133] (5) 用离心管收集细胞悬液,1000rpm离心5min,再用DMEM培养基洗两次;
- [0134] (6) 将细胞用5mL 4℃预冷的0.17M NH4CL缓慢吹吸使其重悬,静置5min,按上面方法离心,吸弃上清液;
- [0135] (7) 加入10mL DMEM培养基混匀。
- [0136] 2.5.3饲养细胞的制备
- [0137] (1) 用已高温消毒好的眼科剪对小鼠进行眼球采血并分离血清(作阴性对照),然后断颈椎使用其死亡;
- [0138] (2) 分离小鼠的皮肤和腹膜,暴露腹腔,缓慢注射2mL DMEM培养液到小鼠腹腔中,然后一手固定注射器,另一手轻轻按摩腹部,将含有巨噬细胞的DMEM培养液收回,注入无菌

的离心管中,重复3次;

[0139] (3) 1000rpm离心5min,然后把上清液弃掉;

[0140] (4) 用5mL HAT(含20%血清)使沉淀的细胞悬浮,混匀后加到12孔板(2滴/孔),放在37℃含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。

[0141] 饲养细胞在细胞融合中起着至关重要的作用,饲养细胞不仅能清除营养液里的死细胞,还能分泌“生长因子”,提高克隆集落的形成机率。

[0142] 2.5.4细胞融合

[0143] (1) 将制备好的骨髓瘤细胞和脾细胞按8:1混合均匀,1000rpm离心10min,尽量完全弃掉上清;

[0144] (2) 用手指弹一下离心管,让细胞松散开来,放入37℃水浴预热,细胞融合剂也要放入37℃水浴预热;

[0145] (3) 缓慢加入1.5mL细胞融合剂,边加快边轻快的转动融合管,1min内要加完,然后室温静置1min;

[0146] (4) 加入DMEM 10mL(37℃预热);

[0147] (5) 在37℃恒温箱中静置10min左右,再1000rpm离心10min,尽量弃完上清液,然后加入HAT重悬;

[0148] (6) 分装到12孔细胞培养板,放在37℃含5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养;

[0149] (7) 每天观察杂交瘤细胞生长情况,3~4d后用HAT培养基换出1/2培养基,以后可根据细胞生长情况每3d换1/2含20%FBS的HT培养基;第14天后可用普通完全培养基。

[0150] 经过每天两次定时观察融合后的细胞发现,融合后的第二天可以明显看到杂交瘤细胞开始长成,两个三个挨在一起;融合后的第三天,融合细胞就开始形成集落,且杂交瘤细胞长得很浑圆,饱满而又均匀;融合后的第七天,杂交瘤细胞已经形成了一个很大的集落,并且紧密挨在一起。

[0151] 细胞融合成功与否取决于很多因素,例如脾细胞和SP2/0细胞的活性、融合方法、培养基、培养条件饲养细胞等,其中小鼠脾细胞和SP2/0细胞的活性是融合成功的前提条件。因此,在融合前24h给细胞换液,12h后重悬,将细胞调整至最佳状态。融合完成后,加入预温至37℃的DMEM培养液,室温静置10min,可以促进已融合细胞的稳定,提高融合成功率。

[0152] 2.6阳性杂交瘤细胞的筛选和培养

[0153] 2.6.1阳性杂交瘤细胞的筛选

[0154] 按前面“2.3”优化的ELISA法来做筛查(至少三次)。

[0155] 2.6.2阳性杂交瘤细胞的克隆化培养

[0156] 对杂交瘤细胞采用有限稀释法进行稀释,再进行克隆化培养。具体方法如下:

[0157] (1) 在克隆之前24~36h,把饲养细胞制备好,操作同“2.5.3”;

[0158] (2) 用HT培养基(含20%血清)把杂交瘤细胞的悬液稀释到含细胞5、15和25、35个/mL4个不同的稀释度,形成浓度梯度;

[0159] (3) 把这四个稀释度的细胞孔,加入培养液吹打均匀,然后分到铺有饲养细胞的96孔细胞培养板里,每个孔100μL。每个稀释度3竖排,所以杂交瘤细胞的数量分别是1、3、5、7个/孔;

[0160] (4) 放到37℃恒温中含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,每天观察情况,2~3天之后,可以

看到克隆的细胞团,收集上清,做抗体检测;

[0161] (5) 取抗体检测结果为阳性的细胞继续扩大培养,进行再克隆,定期筛查三四次后,将阳性克隆率达100%的细胞株及时冻存。

[0162] 以上试验经过二次融合四次筛查得到2G7杂交瘤细胞株。

[0163] 2.7杂交瘤细胞的冻存和复苏

[0164] 2.7.1杂交瘤细胞的冻存

[0165] 杂交瘤细胞通过扩大培养以后生长速度非常的快,稍不注意就衰老死亡,必须及时进行冻存以备后续实验需要,具体的冻存步骤如下:

[0166] (1) 处于对数生长期的细胞,吹下收集,1000rpm离心5min,放到4℃预冷的冻存液中重新悬浮,把细胞浓度调整到 $10^6$ 个/mL,分装于细胞冻存管(1mL/管);

[0167] (2) 在每个冻存管和包装袋上记好细胞的名称、冻存的日期及传代次数等重要信息;

[0168] (3) 先把冻存管放在4℃2个小时,再放到-20℃2个小时,最后放到-80℃24小时以上,第二天转到液氮罐进行长期保存。

[0169] 2.7.2杂交瘤细胞的复苏

[0170] (1) 从液氮罐取出冻存管,然后马上放到37℃的水浴融化,等到最后一点冰快融化完的时候,马上转到离心管,加入DMEM至10mL;

[0171] (2) 然后1000rpm离心10min,吸掉上清液,用DMEM培养基(含20%FBS)使其重悬,转到培养瓶,置于37℃含5%CO<sub>2</sub>的培养箱培养;

[0172] (3) 24h后等细胞贴壁后换掉1/2培养液,之后也还要继续及时换液,把残留的DMSO清除完;

[0173] (4) 传代、扩大培养待其恢复活性后用于后续实验。

[0174] 2.8单抗亚型的鉴定和特异性反应

[0175] 2.8.1亚型鉴定

[0176] (1) 收集复苏之后检查结果良好的2G7杂交瘤细胞株的培养上清液;

[0177] (2) 用“2.3”的间接ELISA方法,对筛选得到的这株细胞株用单克隆抗体亚型鉴定试剂盒进行亚型鉴定;

[0178] (3) OD<sub>450</sub>值最高的项就是相应的亚型。

[0179] 按亚型鉴定试剂盒的说明书说明进行操作,对2G7做亚型鉴定,结果如表3所示。

[0180] 表3亚型鉴定

[0181]

细胞株名称	IgA	IgG1	IgG2b	IgG2a	IgM	IgG3
2G7	0.708	0.901	0.679	0.727	0.758	0.663

[0182] 亚型鉴定结果显示2G7杂交瘤细胞株分泌的抗体的亚型为IgG1型。亚型的鉴定,为选择哪种方法提纯抗体提供了依据,也为后续研究提供参考。

[0183] 2.8.2特异性反应

[0184] (1) 收集复苏之后检查结果良好的2G7杂交瘤细胞株的培养上清液;

[0185] (2) 用水牛血清包板好的酶标板,按照“2.3”的间接ELISA方法,对筛选得到的这株

细胞进行特异性反应的测定；

[0186] (3) 如果细胞株的OD<sub>450</sub>数值高，则说明它们的特异性强。

[0187] 如表4所示，数据结果表明，2G7有很好的特异性，则制备的单抗与大片吸虫分泌排泄抗原没有交叉反应，其可用于水牛大片吸虫抗体的检测。

[0188] 表4特异性反应

[0189]

细胞株名称	水牛 IgG	大片 ES
2G7	2. 549	0. 168
PBS	0. 107	0. 205

[0190] 2.9单克隆抗体腹水的制备和腹水效价的测定

[0191] (1) 选饲养了一周的健康BALB/c雌性小鼠(8周龄左右)，腹腔接种降植烷，0.4mL/只；制备腹水过程中，为了抑制小鼠对杂交瘤细胞的排斥反应，预先腹腔接种降植烷，使其产生免疫抑制。

[0192] (2) 过了7天后通过腹腔接种杂交瘤细胞2G7(用不含血清的培养基稀释，细胞浓度调整到 $3 \times 10^6$ 个/mL)，每只小鼠接种的量是 $5 \times 10^5$ /0.2mL；接种的细胞浓度直接影响产生的腹水质量，一般细胞浓度在 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL都可以，过多过少均不好。

[0193] (3) 接种后一周左右，就可以看到小鼠的腹腔肿大得很明显(用手触摸的感觉就像是鼓足了气的皮球)，这时候可以用注射器采集腹水了；

[0194] (4) 将采集到的腹水12000rpm离心20min，收集培养上清液，用“2.3”的间接ELISA方法测定抗体效价，将效价高的分装，-20℃冻存备用。

[0195] 对2G7杂交瘤细胞株制备的腹水进行效价测定，结果如表5所示，2G7杂交瘤细胞株腹水的效价为 $1:4 \times 10^3$ 。

[0196] 表5 2G7细胞株腹水效价测定

稀释倍数	2G7
$1 \times 10^3$	1. 124
$2 \times 10^3$	0. 752
$4 \times 10^3$	0. 363
[0197] $8 \times 10^3$	0. 291
$16 \times 10^3$	0. 269
$32 \times 10^3$	0. 271
$64 \times 10^3$	0. 204
空白值	0. 153

[0198] 综上，抗水牛IgG杂交瘤细胞株2G7经多次传代后，依然具有分泌高效价抗体的能

力,效价均为1:256以上。杂交瘤细胞株2G7的成功收获为建立诊断和监测水牛病的方法和进一步分析水牛IgG表面抗原功能奠定基础。

[0199] 水牛大片形吸虫抗体的检测

[0200] 试剂准备:水牛血清、抗牛IgG单克隆抗体、阳性血清、阴性血清、正辛酸-饱和硫酸铵溶液、三蒸水、0.06mol/LpH4.8醋酸盐缓冲液、0.01mol/LpH7.4磷酸盐缓冲液(PBS)、0.1mol/LK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、0.5%吐温一磷酸盐缓冲液(PBST)、TMB显色液、终止液(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、底物缓冲液、羊抗鼠二抗(HRP标记)。

[0201] 正辛酸-饱和硫酸铵溶液pH 7.4,组成:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 400~425g;H<sub>2</sub>O 500mL;15MNH<sub>4</sub>OH pH 7.4;用前配制。

[0202] 0.06M醋酸盐缓冲液pH 4.8,放置4℃备用,组成:

[0203] A液(0.06M NaAc):无水NaAc 0.49218g;H<sub>2</sub>O 100mL;

[0204] B液(0.06M HAc):冰醋酸0.344mL;H<sub>2</sub>O 100mL。

[0205] 应用液:A液59mL;B液41mL;5M NaOH pH 4.8。

[0206] 磷酸盐缓冲液(PBS)PH 7.4,组成:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g;Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> 1.44g;NaCL 8.0g;KCL 0.2g;H<sub>2</sub>O 1000mL;用前配制。

[0207] 0.5%吐温一磷酸盐缓冲液(PBSt):PBS 497.5mL;吐温-20 2.5mL;用前配制。

[0208] 1M的碳酸盐溶液(Carbonate 1M)PH 9.5,组成:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 16.5g;NaHCO<sub>3</sub> 28g;H<sub>2</sub>O 500mL;放置4℃备用。

[0209] 0.1M的碳酸盐溶液(Carbonate 0.1M) pH 9.6,组成:Carbonate 1M pH9.5 5mL;H<sub>2</sub>O 45mL。

[0210] 建立ELISA方法对水牛大片形吸虫抗体进行检测:

[0211] 3.1抗原的制备

[0212] 收集新鲜大片吸虫成虫(场所为广西各屠宰场),通过生理盐水将其洗涤,然后置放在pH值为7.2,浓度为0.01mol/L的PBS培养液内,在37℃的温度下进行3小时的培养,于4℃,5000r/min离心三十分钟,选取上清液,也就是大片吸虫ES粗抗原,应用孔径为0.22μm的滤膜来过滤上清液,在其冷冻干燥之后储备于-20℃中以备用。

[0213] 3.2单克隆抗体的提纯

[0214] 辛酸-硫酸铵沉淀纯化单克隆抗体:

[0215] (1)把步骤“2.9”冻存的小鼠腹水置于4℃下12000r/min进行15min离心,将沉淀杂质除去;

[0216] (2)以1:2比例混合腹水和醋酸盐缓冲液,在室温搅拌下将正辛酸逐滴添加,加完搅拌混合30分钟;

[0217] (3)静止2h以上,使其充分沉淀;

[0218] (4)在4℃下12000r/min离心30分钟,去除沉淀;

[0219] (5)将上清液用定性滤纸过滤后,滤液加入上清液体积1:10的1.5M pH7.4的PBS;

[0220] (6)将上清液置于冰浴状态下,30min内边搅拌边缓慢加入等体积的饱和硫酸钠溶液,4℃静置过夜(或静置2h以上);

[0221] (7)在低温高速离心机12000r/min下离心30min,弃去上清液;

[0222] (8)沉淀用适量含137mM NaCl、0.2mM EDTA、2.6mM KC1的pH 7.4PBS溶解,上述PBS

中4℃透析,每4h换液一次,期间换液3-5次;

[0223] (9) 取少量透析液后样品适当稀释,以BCA蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度,并用间接ELISA方法检测效价。将剩余样品分装,-20℃保存备用。

[0224] 抗水牛IgG单克隆抗体的效价测定:按照公式P/N=(D待测样本孔-D空白孔)/(D阴性对照孔-D空白孔)计算,如果P/N>2.1,则样品判为阳性,也就是在OD值超过0.416便能够将其判别成抗体阳性。通过表6的结果可知,运用间接ELISA法对抗水牛IgG单克隆抗体进行检测后,其效价大于1:64000。

[0225] 表6抗水牛IgG单克隆抗体的效价测定

稀释比例	吸光值
[0226]	1: 1000
	1: 2000
	1: 4000
	1: 8000
	1: 16000
	1: 32000
	1: 64000
空白	0.198

[0227] 3.3建立检查大片吸虫抗体的ELISA最优反应条件的优化

[0228] 通过棋盘法分别确定该方法的抗原包被浓度、一抗稀释倍数、二抗稀释倍数、血清稀释倍数等,根据OD值和P/N值确定并建立间接ELISA方法。

[0229] ①包被:用包被缓冲液稀释大片吸虫排泄抗原,稀释浓度为5μg/mL,10μg/mL,20μg/mL,100μL/孔,37℃放置2h,或者4℃过夜。

[0230] ②封闭:用PBSt洗涤3次,每次5min,配制5%的脱脂奶粉(Skim Milk)溶液,200μL/孔,37℃作用2h,或者4℃过夜,PBSt洗涤3次,每次5min。

[0231] ③血清稀释:用PBSt稀释血清,不同的稀释度1:100,1:200,1:400,1:800,100μL/孔,37℃作用1h,PBSt洗涤3次,每次5min。

[0232] ④加2G7单克隆抗体:不同的稀释,1:1000,1:2000,1:5000,100μL/孔,37℃温育40min,PBSt洗涤3次,每次5min。

[0233] ⑤酶标羊抗鼠IgG:用PBSt稀释酶标羊抗鼠IgG,1:5000,100μL/孔,37℃作用40~60min,PBSt洗涤3次,每次5min。

[0234] ⑥底物:按前面的底物配置方法配制,100μL/孔,37℃避光作用10min。

[0235] ⑦终止:加终止液,50μL/孔。

[0236] ⑧450酶标仪读数。

[0237] 从抗原包被浓度、一抗2G7稀释浓度、二抗羊抗鼠稀释浓度、血清稀释浓度四个方面对预试验建立的间接ELISA体系进行条件优化。

[0238] 表7间接ELISA条件优化

[0239]

抗原浓度	5μg/ml			10μg/ml			20μg/ml			2G7 稀释度
	阳性	阴性	P/N	阳性	阴性	P/N	阳性	阴性	P/N	
1:100	1.198	0.096	12.48	1.20	0.084	<b>14.29</b>	1.236	0.078	<b>15.85</b>	1:5000
	1.056	0.088	12.00	1.006	0.078	12.90	1.046	0.100	10.46	1:10000
1:200	1.058	0.097	10.91	0.962	0.092	10.46	1.05	0.105	10.00	1:5000
	0.799	0.077	10.38	0.781	0.071	11.00	0.864	0.078	11.08	1:10000
1:400	0.773	0.053	<b>14.58</b>	0.835	0.065	12.85	0.946	0.068	13.91	1:5000
	0.734	0.075	9.79	0.742	0.072	10.31	0.783	0.073	10.73	1:10000
1:800	0.889	0.125	7.11	0.868	0.117	7.42	0.930	0.137	6.79	1:5000
PBS	0.082	0.073	1.12	0.074	0.091	0.81	0.080	0.085	0.94	
二抗稀释度	1: 5000	1: 10000		1: 5000	1: 10000		1: 5000	1: 10000		

[0240] 表7的结果显示, P/N值最大的三组条件分别是: 抗原包被浓度20ug/ml/一抗2G7稀释浓度1:5000/二抗羊抗鼠稀释浓度1:5000/血清稀释浓度1:100 (P/N=15.85) ; 抗原包被浓度5ug/ml/一抗2G7稀释浓度1:5000/二抗羊抗鼠稀释浓度1:5000/血清稀释浓度1:400 (P/N=14.58) ; 抗原包被浓度10ug/ml/一抗2G7稀释浓度1:5000/二抗羊抗鼠稀释浓度1:5000/血清稀释浓度1:100 (P/N=14.29) 。综合考虑一抗成本和检测灵敏度等因素, 最适抗原包被浓度为5ug • ml<sup>-1</sup>, 最适一抗2G7稀释浓度为1:5000, 最适二抗羊抗鼠稀释浓度为1:5000; 血清稀释浓度为1:400。

[0241] 3.4用间接ELISA法对水牛血清进行抗体检测

[0242] (1)包被: 抗原100μL/孔, 37℃温箱, 2h或4℃过夜;

[0243] (2)洗板: 洗涤液PBST 200ul/孔, 洗3次, 每次间隔5min;

[0244] (3)封闭: 5%脱脂奶粉200ul/孔, 37℃温箱, 2h或4℃过夜;

[0245] (4)洗板: 洗涤液PBST200μL/孔, 洗3次, 每次间隔5min;

[0246] (5)加待测血清: 加待测血清以1:200的浓度稀释(稀释液为PBS), 100μL/孔, 其中两孔加上实验室保存的阴性血清作为对照, 37℃温箱, 1h;

[0247] (6)洗板: 洗涤液PBST 200ul/孔, 洗3次, 每次间隔5min;

[0248] (7)加2G7单克隆抗体: 加实验室自制2G7单克隆抗体(1:5000)稀释, 100ul/孔, 37℃温育40min;

[0249] (8)PBS洗涤3次, 每次5min;

[0250] (9)加酶标二抗: 加HRP标记的羊抗鼠 IgG (1:5000) 稀释, 100ul/孔, 37℃温箱, 1h;

[0251] (10)洗板: 洗涤液PBST 200μL/孔, 洗3次, 每次间隔5min;

[0252] (11)加底物: 加新配置的显色液(底物缓冲液10ml、TMB 1ml、0.75% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 100μL/孔, 37℃温箱, 避光, 10~20分钟;

[0253] (12)加终止液: 50μL/孔, 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;

[0254] (13)测值: 酶标仪测定各孔OD<sub>450</sub>数值。

[0255] 临床样本检测的阴阳临界值是0.130,空白对照与阴阳对照成立,总计随机检测27份血清,阳性为4份,表8为其检测结果。

[0256] 表8间接ELISA临床样本检测

	血清样品	OD 值 1	OD 值 2	血清样品	OD 值 1	OD 值 2
[0257]	1	<b>0.141</b>	<b>0.156</b>	16	0.095	0.115
	2	0.116	0.126	17	0.079	0.087
	3	0.095	0.121	18	0.088	0.089
	4	0.078	0.113	19	0.078	0.076
	5	0.073	0.105	20	0.069	0.071
	6	0.105	0.096	21	0.098	0.092
	7	<b>0.150</b>	<b>0.138</b>	22	<b>0.137</b>	<b>0.128</b>
	8	0.088	0.081	23	0.087	0.086
[0258]	9	0.103	0.092	24	0.106	0.109
	10	0.109	0.093	25	0.082	0.104
	11	0.090	0.088	26	0.090	0.093
	12	0.079	0.113	27	0.078	0.087
	13	0.107	0.145	阳性	0.903	0.887
	14	<b>0.145</b>	<b>0.137</b>	空白	0.095	0.113
	15	0.105	0.087	PBS	0.086	0.079

[0259] 目前,关于大片吸虫间接ELISA检测方法的报道相对较少,本发明选取自制的抗大片吸虫分泌排泄抗原单克隆抗体2G7作为第一抗体,用羊抗鼠酶标二抗作为第二抗体,成功建立了间接ELISA方法。

[0260] 在间接ELISA方法构建时,选取抗体非常关键,选择单抗作为第一抗体来对样品中的抗原进行获取,将相应多抗视为第二抗体,为相对理想的方案,由于单克隆抗体是对于单抗原决定簇的,存在着表位特异性。本发明借助单克隆抗体而检测,其结果理想。单抗为关键的免疫学工具,其对检测治疗病原以及研究免疫机制发挥着十分重要的作用。在病原学诊断方式的构建中,所构建诊断方式的特异性直接决定了单抗的特异性。利用本发明的间接ELISA方法对水牛血清样本进行检测,检测结果表明建立的间接ELISA方法对大片吸虫抗体的特异性是很高的。

[0261] 虽然本发明已以较佳实施例揭示如上,然其并非用以限制本发明,任何本领域技术人员,在不脱离本发明的精神和范围内,当可做些许的修改和完善,因此本发明的保护范围当以权利要求书所界定的为准。

专利名称(译)	抗水牛IgG单克隆抗体细胞株及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109507421A</a>	公开(公告)日	2019-03-22
申请号	CN201811495602.3	申请日	2018-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	广西大学		
申请(专利权)人(译)	广西大学		
当前申请(专利权)人(译)	广西大学		
[标]发明人	吴文德 侯林静		
发明人	吴文德 张为宇 侯林静		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/535 G01N33/577		
代理人(译)	韦莎		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明公开了抗水牛IgG单克隆抗体细胞株及其制备方法和应用。本发明采用自主制备得到的抗水牛IgG单克隆抗体2G7建立检测水牛大片吸虫抗体的ELISA方法，可大量地对水牛进行快速准确的检测大片形吸虫病，对水牛实时情况进行检测，在预防或及时发现已患病的水牛的情况中有重要作用，能极大地加强水牛大片吸虫的防控力度。

血清稀释倍数	水牛血清稀释50倍			水牛IgG(0.3 μg/mL)		
	1号	3号	阴性	1号	3号	阴性
$1 \times 10^3$	1.387	1.811	0.192	1.338	1.680	0.151
$2 \times 10^3$	0.821	1.003	0.131	0.927	1.091	0.148
$4 \times 10^3$	0.407	0.620	0.116	0.610	0.684	0.232
$8 \times 10^3$	0.291	0.365	0.099	0.335	0.477	0.136
$16 \times 10^3$	0.155	0.289	0.085	0.281	0.700	0.159
$32 \times 10^3$	0.110	0.166	0.091	0.150	0.382	0.130
$64 \times 10^3$	0.124	0.103	0.056	0.121	0.260	0.125
空白值	0.078	0.069	0.070	0.077	0.071	0.080