



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111041000 A

(43)申请公布日 2020.04.21

(21)申请号 201911407906.4

C07K 16/10(2006.01)

(22)申请日 2019.12.31

G01N 33/68(2006.01)

(83)生物保藏信息

G01N 33/577(2006.01)

CCTCC NO:C2019269 2019.10.22

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(71)申请人 江苏省农业科学院

C12R 1/91(2006.01)

地址 210014 江苏省南京市玄武区钟灵街
50号

(72)发明人 李文良 张聪 张纹纹 陈亚玲

杨蕾蕾 毛立 李基棕 孙敏

刘茂军

(74)专利代理机构 南京汇盛专利商标事务所

(普通合伙) 32238

代理人 袁静

(51)Int.Cl.

C12N 5/20(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

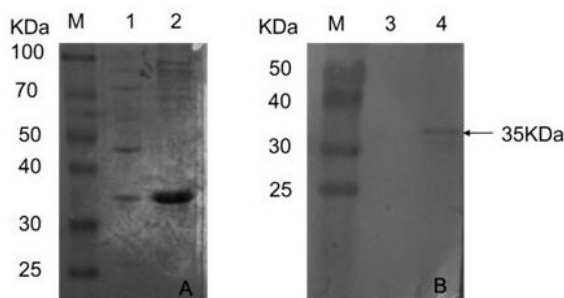
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一株分泌抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体的
杂交瘤细胞株及其应用

(57)摘要

本发明提供一株分泌抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用,属于生物技术领域。分泌抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株2D6D10,其保藏编号为CCTCC NO:C2019269。本发明还提供所述杂交瘤细胞株分泌的抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体及其在制备裂谷热病毒NSs蛋白抗体检测试剂盒方面的应用。本发明杂交瘤细胞2D6D10能够产生针对RVFV非结构蛋白NSs蛋白的单克隆抗体,该单克隆抗体具有阻断作用,因此本发明的阻断ELISA试剂盒可用于病毒感染与灭活疫苗或缺失疫苗免疫抗体的鉴别诊断。



1. 分泌抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株2D6D10,其保藏编号为 CCTCC NO :C2019269。
2. 权利要求1所述杂交瘤细胞株2D6D10分泌的抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体。
3. 权利要求2所述抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体在制备裂谷热病毒NSs蛋白抗体检测试剂盒方面的应用。
4. 根据权利要求3所述应用,其特征在于所述抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体是将杂交瘤细胞2D6D10株注射到BALB/c小鼠腹腔,制备腹水,离心并收集腹水上清液,纯化后得到。
5. 根据权利要求4所述应用,其特征在于所述抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体经HRP进行标记。
6. 根据权利要求5所述应用,其特征在于所述试剂盒还包括采用NSs蛋白包被的酶标板。
7. 根据权利要求6所述应用,其特征在于所述试剂盒还包括阴性对照血清、阳性对照血清、TMB底物显色液及终止液。

一株分泌抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株 及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种分泌抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用。

背景技术

[0002] 裂谷热(Rift valley fever,RVF)是由裂谷热病毒(Rift valley fever virus,RVFFV)引起反刍动物和人发病的人兽共患病。本病对反刍动物如绵羊、山羊、牛的影响较为严重,感染后出现疑似流感的症状,严重者导致怀孕母畜流产,在幼龄动物中有较高的死亡率。人对RVFFV易感,可通过接触、处理感染性材料或通过蚊虫媒介叮咬感染,感染后可表现为疲劳、头痛、发热、肌肉关节疼痛、黄疸,甚至脑炎、出血热等,严重者可导致死亡。

[0003] 裂谷热病毒(Rift Valley fever virus,RVFFV)属于布尼亚病毒科白蛉病毒属,是一种负链RNA病毒,基因组包含三个节段:L、M、S。大片段(L)编码的RNA依赖性RNA聚合酶。中片段(M)主要编码囊膜糖蛋白。小片段(S)双义编码核衣壳蛋白N和非结构蛋白NSs。

[0004] 裂谷热主要在西非和其他一些非洲国家呈地方性流行,在强降雨后牲畜和人群中周期性流行。2000年病毒被传播到阿拉伯半岛,引起沙特和也门的疫情大暴发,这也是该病第一次被传播到在非洲大陆以外的地方。我国于2016年报道首例输入性裂谷热病例。随着全球气候变暖、贸易及人员流动频繁,裂谷热传入的风险进一步增大。

[0005] 目前已研制灭活疫苗和弱毒疫苗用于该病的免疫防控。但仍需建立特异的诊断方法,尤其是鉴别诊断技术用于该病的鉴别诊断。RVFFV的实验室检测主要有ELISA、RT-PCR、病毒分离等,其中已报道以N蛋白为包被靶抗原的ELISA方法用于病毒抗体检测,但该方法无法区别感染抗体与免疫抗体。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种分泌具有阻断作用的抗RVFFV NSs蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0007] 本发明的另一目的是提供所述杂交瘤细胞株分泌的抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体。

[0008] 本发明的再一目的是提供所述抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体在制备裂谷热病毒NSs蛋白抗体检测试剂盒方面的应用。

[0009] 本发明的目的采用如下技术方案实现。

[0010] 分泌抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株2D6D10,其保藏编

[0011] 号为CCTCC NO:C2019269。

[0012] 在本发明中,所述杂交瘤细胞株2D6D10分泌的抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体。

[0013] 在本发明中,所述抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体在制备裂谷热病毒NSs蛋白抗体检测试剂盒方面的应用。

[0014] 在本发明中,所述抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体是将杂交瘤细胞2D6D10株注射到BALB/c小鼠腹腔,制备腹水,离心并收集腹水上清液,纯化后得到。

[0015] 在本发明中,所述抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体经HRP进行标记。

[0016] 在本发明中,所述试剂盒还包括采用NSs蛋白包被的酶标板。

[0017] 在本发明中,所述试剂盒还包括阴性对照血清、阳性对照血清、TMB底物液及终止液。

[0018] 有益效果:RVFV病毒自然感染后可诱导机体产生针对NSs蛋白的特异性抗体,而灭活疫苗或缺失疫苗免疫的个体无此抗体产生。本发明筛选出了杂交瘤细胞株2D6D10,该杂交瘤细胞株能够产生针对RVFV非结构蛋白NSs蛋白的单克隆抗体,该单克隆抗体具有阻断作用。本发明试剂盒可区分RVFV N蛋白抗体与RVFV NSs蛋白抗体,因此可用于病毒感染与灭活疫苗或缺失疫苗免疫抗体的鉴别诊断;另外本发明试剂盒还具有良好的特异性和重复性。

附图说明

[0019] 图1RVFV NSs蛋白的表达与鉴定(A:SDS-PAGE;B:Western blot),其中M:蛋白Marker;1:pET-28a-NSs (BL21) 裂解液上清;2:pET-28a-NSs (BL21) 裂解液沉淀;3:阴性对照蛋白;4:纯化的RVFV NSs蛋白。

[0020] 图2血清最佳稀释度的选择。

具体实施方式

[0021] 实施例1重组蛋白的制备

[0022] 1. 重组质粒的构建与蛋白表达

[0023] 根据Genbank公布的裂谷热病毒NSs基因序列(HE687307),得到如SEQ ID NO:1所示的序列。合成SEQ ID NO:1所示的序列,克隆入pET-28a(+)获得重组质粒pET-28a-NSs。将重组质粒pET-28a-NSs转化至大肠杆菌感受态细胞,挑取阳性菌落,PCR鉴定正确后命名为pET-28a-NSs (BL21)。将pET-28a-NSs (BL21) 接种至含卡那霉素的LB液体培养基培养,当OD₆₀₀达到0.6-0.8时加入0.5mmol/L IPTG,37℃诱导表达5h,收集菌体后超声波裂解,分别收集裂解液上清和沉淀,经SDS-PAGE凝胶电泳鉴定重组蛋白的表达情况。将pET-28a(+)转化至大肠杆菌感受态细胞,得到对照菌。采用上述方法培养对照菌,取裂解液作为阴性对照蛋白。从图1(A)可见,pET-28a-NSs (BL21) 裂解液上清和沉淀泳道上均存在35kDa的目的条带,说明重组NSs蛋白在上清和沉淀中均有表达,且主要以包涵体形式存在。

[0024] 2. 重组NSs蛋白的纯化、鉴定

[0025] 将重组菌pET-28a-NSs (BL21) 接种至200mL含卡那霉素的LB液体培养基中培养,待OD₆₀₀达到0.6-0.8时,加入终浓度为0.5mmol/L的IPTG,37℃诱导5h,收集细菌于50mL离心管,在8000rpm/min条件下低温离心10min,弃上清,加入20mL的PBS将菌体重悬。超声破碎菌体,离心收集沉淀,加入含8M尿素的PBS(pH=7.4)溶解,然后静置过夜,按照HisTrapTMHP(GE公司)纯化说明书纯化重组蛋白,得到纯化的重组NSs蛋白。测定纯化的重组NSs蛋白浓度,分装保存于-20℃。

[0026] 3. 重组NSs蛋白的鉴定

[0027] 将纯化的重组NSs蛋白与上样缓冲液混合,煮沸后进行12%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),结束后采用半干转印法将蛋白转印到硝酸纤维素膜上,用5%的脱脂乳封闭2h。PBST洗涤3次,加入1:1000稀释的His标签单克隆抗体,室温孵育1h。PBST洗涤3次,加入1:5000稀释的HRP标记的山羊抗小鼠IgG二抗,室温孵育1h。PBST洗涤3次,按照DAB显色试剂盒说明进行显色。从图1(B)可见,纯化的重组NSs蛋白泳道上在35kDa处有特异性条带,纯化的重组NSs蛋白可与His抗体反应,表明其正确表达且具有良好的反应性。

[0028] 实施例2单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

[0029] 1. 免疫BALB/c小鼠

[0030] 将100 μ g重组NSs蛋白与弗氏佐剂按照体积比为1:1混合乳化后皮下多点注射免疫BALB/c小鼠(100 μ g/只)。之后加强免疫两次,每次与前次免疫间隔两周,每次加强免疫均采用100 μ g重组NSs蛋白与不完全弗氏佐剂1:1混合乳化的混合物。共免疫3次。第三次免疫2周后采血,采用间接ELISA检测免疫小鼠的血清效价。间接ELISA方法如下:将重组NSs蛋白以浓度为2 μ g/mL包被96孔酶标板,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。PBST洗涤3次,拍干;加入含0.5%BSA的PBST(含0.5%吐温-20的PBS)封闭2h;加入2倍倍比稀释的免疫前后的小鼠血清,37 $^{\circ}$ C孵育1h, PBST洗涤3次,拍干;加入1:4000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG(北京全式金生物科技有限公司),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h, PBST洗涤3次,拍干。加入底物液TMB,室温避光显色10min;每孔加入50 μ L、2mol/L的硫酸溶液终止反应。酶标仪测定酶标板OD_{450nm}值,P为各检测孔的OD_{450nm}值,N为阴性血清(免疫前血清)的OD_{450nm}值,以P/N \geq 2.1的血清最大稀释度作为其效价。选取效价 >51200 的小鼠,细胞融合前4d采用100 μ g重组NSs蛋白腹腔注射进行加强免疫一次。

[0031] 2. 细胞融合

[0032] 采取PEG细胞融合方法,具体操作如下:取小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)与免疫的BALB/c小鼠(本实施例标题1所选小鼠)脾脏细胞按1:5的比例充分混匀,2000rpm离心5min,弃上清,再加入适量的无血清RPMI-1640培养基(购自Hyclone)重悬,2000rpm离心5min以清洗细胞,弃上清,轻击管底,使细胞松散均匀,置37 $^{\circ}$ C水浴预热,1min内加入0.8mL在37 $^{\circ}$ C水浴预热的PEG2000,边加边振荡。加完后继续振荡1min,然后在5min内按照1mL/min、2mL/min、3mL/min、3mL/min、3mL/min的速度分别加入预热至37 $^{\circ}$ C的无血清RPMI-1640培养基,37 $^{\circ}$ C静置10min,2000rpm、25 $^{\circ}$ C条件下离心5min,弃上清,加入含20%FBS和20%HAT的RPMI-1640培养基重悬,分装到已铺有小鼠腹腔巨噬细胞的96孔板中,于5%CO₂培养箱培养。其间观察孔中细胞情况,融合5d后更换新的营养液继续培养,细胞生长至96孔板孔底面积1/10~1/5时,取上清进行间接ELISA抗体检测,方法见本实施例标题3。

[0033] 3. 杂交瘤细胞的间接ELISA检测与筛选

[0034] 以0.05mol/L、pH9.6碳酸盐缓冲液为包被液稀释重组NSs蛋白至浓度为2 μ g/mL,包被96孔酶标板,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。PBST洗涤3次,拍干;将细胞上清、小鼠阳性血清以及阴性血清(免疫小鼠血清)加入相应的孔内,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h, PBST洗涤3次,拍干;加入1:4000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG(北京全式金生物科技有限公司),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h, PBST洗涤3次,拍干。加入底物液TMB,100 μ L/孔,室温避光显色10min;每孔加入50 μ L、2mol/L的硫酸溶液终止反应。酶标仪测定酶标板OD_{450nm}值,P为各检测孔的OD_{450nm}值,N为阴性血清的OD_{450nm}值,以P/N \geq 2.1作为阳性孔的判定标准,选择检测结果为阳性、抗体效价高

且生长状态良好的杂交瘤细胞株进行亚克隆。

[0035] 4. 杂交瘤细胞的克隆化

[0036] 将筛选出的阳性孔细胞株用台盼蓝染色,计数,用含20%FBS(胎牛血清)的RPMI-1640培养基稀释成100个细胞/10mL培养基,将稀释后的细胞悬液加入提前铺有小鼠腹腔巨噬细胞的96孔板,每孔100 μ L,置37℃、5%CO₂培养箱中培养,其间观察细胞株,待生长至96孔板孔底面积1/10~1/5时,按照本实施例标题3中间接ELISA方法及时进行ELISA检测。记录单克隆细胞的阳性孔,并进行同样的亚克隆3次以上,直至克隆后所有的克隆细胞株上清检测均为阳性且各孔检测的OD_{450nm}值较接近。最终筛选到了杂交瘤细胞株2D6D10。将杂交瘤细胞株2D6D10进行扩大培养,-20℃冻存。

[0037] 杂交瘤细胞株2D6D10的保藏信息如下:分类命名为杂交瘤细胞株2D6D10,保藏日期为2019年10月22日,保藏单位全称为中国典型培养物保藏中心,简称CCTCC,保藏单位地址为武汉大学,保藏编号为CCTCC NO:C2019269。

[0038] 5. 腹水的制备与纯化标记

[0039] 将灭菌的液体石蜡腹腔注射10~12周龄的BALB/c小鼠(购自扬州大学比较医学实验中心),0.3mL/只。7d后,每只小鼠腹腔注射0.2mL杂交瘤细胞株2D6D10悬液(含有 2×10^6 个杂交瘤细胞)。7~10d后,收取腹部明显鼓起的小鼠的腹水,3000rpm离心20min,收集上清,间接ELISA检测效价为204800,用Protein A/G琼脂糖凝胶层析柱纯化腹水中的单克隆抗体,记为抗NSs蛋白的单克隆抗体2D6D10。纯化的单克隆抗体2D6D10的浓度为1.05mg/mL,效价为204800。采用戊二醛法将抗NSs蛋白的单克隆抗体2D6D10进行HRP标记,得到HRP标记的抗NSs蛋白单克隆抗体2D6D10,缩写为HRP-2D6D10。当HRP-2D6D10浓度为1mg/mL时,其效价为102400。分装后-20℃冻存。

[0040] 实施例3RVFV NSs阻断ELISA抗体检测方法的建立

[0041] 1. 抗原的包被浓度及酶标单抗稀释度的确定

[0042] 采用方阵滴定法,将重组NSs蛋白用抗原包被液(0.05mol/L、pH9.6碳酸盐缓冲液)稀释成0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、2 μ g/mL、4 μ g/mL浓度,每孔分别加入100 μ L,4℃孵育过夜;PBST(含0.5%吐温-20的PBS)洗涤3次;每孔加入300 μ L含0.5%BSA的PBST,37℃封闭2h;PBST洗涤3次;每个抗原浓度分别加入1:10稀释的RVFV阴阳性血清,37℃孵育1h;PBST洗涤3次;分别加入100 μ L采用PBST按照稀释度为1:500、1:1000、1:1500、1:2000、1:2500、1:3000稀释的HRP-2D6D10(HRP-2D6D10稀释前浓度为1mg/mL),37℃孵育1h;PBST洗涤3次;每孔加入50 μ L TMB底物显色液,显色10min。加入50 μ L浓度为2mol/L硫酸溶液终止反应。置酶标仪读取OD_{450nm}值。根据OD_{450nm}值计算阻断率PI(%), $PI = 100 \times (\text{阴性血清OD}_{450nm} \text{值} - \text{阳性血清OD}_{450nm} \text{值}) / \text{阴性血清OD}_{450nm} \text{值}$ 。结果如表1所示,选择阴性血清OD_{450nm}值最接近1.0且阻断率最高的条件为最佳条件;最终确定抗原的包被浓度为2 μ g/mL,初始浓度为1mg/mL的HRP-2D6D10的稀释度为1:1000。

[0043] 其中,RVFV阳性血清为裂谷热病毒重组NSs蛋白免疫的羊血清(采用实施例2标题3中间接ELISA方法检测,效价达到12800),RVFV阴性对照为健康山羊血清。

[0044] 表1阻断ELISA方阵滴定试验

[0045]

抗原浓度 ($\mu\text{g/mL}$)		HRP-2D6D10 不同稀释度					
		1:500	1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000
0.5	P	0.517	0.534	0.4575	0.4585	0.4485	0.453
	N	0.182	0.181	0.163	0.146	0.155	0.13
	PI	64.8	66.10	64.37	68.16	65.44	71.30
1.0	P	0.846	0.841	0.736	0.786	0.7615	0.769
	N	0.195	0.181	0.163	0.146	0.155	0.145
	PI	76.95	78.48	77.85	81.42	79.65	81.14
2.0	P	1.131	1.01	0.945	0.9505	0.8535	0.8535
	N	0.204	0.181	0.173	0.176	0.165	0.155
	PI	81.96	82.08	81.69	81.48	80.67	81.84
4.0	P	1.159	1.0795	0.9815	1.016	0.945	1.022
	N	0.213	0.205	0.208	0.199	0.183	0.189
	PI	81.62	81.00	78.81	80.41	80.63	81.51

[0046] 备注:表1中N为阴性血清OD_{450nm}值,P为阳性血清OD_{450nm}值。

[0047] 2. 待检血清的最佳稀释度的筛选

[0048] 按照本实施例标题1中确定的抗原浓度包被酶标板,PBST洗涤3次后,将RVFV阴性血清采用PBST按稀释度为1:1、1:2、1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160进行稀释,分别加入检测孔,后续其他操作同本实施例标题1中方法,计算阻断率。如图2所示RVFV阳性血清的稀释度从1:1到1:20均维持较高的阻断率,从1:40开始下降,阴性血清在稀释度为1:20时降至较低水平。由于RVFV阴性血清在1:20时阻断率显著区分,因此将1:20定为血清的最佳稀释度。

[0049] 3. 血清最佳孵育时间的筛选

[0050] 按照本实施例标题2确定的检测方法检测RVFV阴性血清,考察血清孵育时间分别为0.5、0.75h、1h、1.5h时的阻断率。结果如表2所示,当血清孵育45min时,阻断率达到最高,因此将其确定为血清最佳孵育时间。

[0051] 表2血清最佳孵育时间的选择

[0052]

血清孵育时间/h	阳性血清阻断率%
0.5	83.4
0.75	85.2
1	80.0

[0053]

1.5	77.6
-----	------

[0054] 4. HRP-2D6D10最佳作用时间的筛选

[0055] 按照本实施例标题3确定的检测方法检测RVFV阴性血清,仅仅改变HRP-2D6D10的孵育时间为0.5、0.75h、1h、1.5h,计算阻断率,以考察酶标单抗的作用时间对阻断率的影响。结果如表3所示,当酶标单抗作用45min时,血清的阻断率最高,因此将45min定为最佳作

用时间。

[0056] 表3酶标单抗最佳孵育时间的选择

[0057]	酶标单抗作用时间/h	阳性血清阻断率%
	0.5	78.3
	0.75	83.7
	1.0	75.9
	1.5	72.4

[0058] 5.最佳显色时间的筛选

[0059] 按照本实施例标题4确定的条件检测RVFV阴阳性血清,仅仅改变显色时间为5、10、15、20min,计算阻断率,以考察显色时间对阻断率的影响。如表4所示,当显色时间达到10min的时候,阻断率最高,所以将显色时间确定为10min。

[0060] 表4最佳显色时间的筛选

[0061]	显色时间/min	阳性血清阻断率%
	5	74.5
	10	85.7
	15	83.3
	20	80.1

[0062] 6.Out-off的确定

[0063] 使用45份RVFV抗体阴性的羊血清,使用本实施例标题5确定的检测方法进行测定,并算出相应的阻断率。具体结果见表5,45份血清样品的平均阻断率为9.99%,标准差为9.61,所以,当检测血清的阻断率 $\leq X+2SD=29.21\%$ 时,该血清为阴性;当检测血清的阻断率 $\geq X+3SD=38.82\%$ 时,该血清为阳性;当检测血清的阻断率大于29.21%且小于38.82%时,为可疑,需要重新进行检验。

[0064] 表5临界值的确定

[0065]	血清 编号	阻断率 (PI)%	血清 编号	阻断率 (PI)%	血清 编号	阻断率 (PI)%	血清编 号	阻断率 (PI)%	血清编号	阻断率 (PI)%
	1	17.21	10	3.25	19	12.60	28	10.06	37	14.87
	2	35.07	11	3.12	20	1.11	29	2.86	38	21.43
	3	0.13	12	2.73	21	19.48	30	10.0	39	6.30
	4	-0.07	13	10.71	22	8.77	31	34.68	40	10.20
	5	16.37	14	4.48	23	0.52	32	6.43	41	10.46
[0066]	6	5.13	15	3.57	24	7.01	33	24.22	42	0.58
	7	14.22	16	14.29	25	18.31	34	12.86	43	5.58
	8	7.27	17	11.30	26	11.10	35	-3.70	44	21.82
	9	15.32	18	-21.88	27	10.58	36	10.97	45	18.38
	X=9.99		SD=9.61		X+2SD=29.21		X+3SD=38.82			

[0067] 备注:表5中X表示平均阻断率,SD表示标准差。

[0068] 实施例4RVFV NSs阻断ELISA抗体检测试剂盒的组装、使用方法与应用

[0069] 1.试剂盒组装

[0070] RVFV NSs阻断ELISA抗体检测试剂盒(以下缩写为本发明试剂盒)包括如下试剂:

[0071] (1) 抗原包被板

[0072] 将重组NSs蛋白用抗原包被液(0.05mol/L、pH9.6碳酸盐缓冲液)稀释成2 μ g/mL,酶标板的每孔分别加入100 μ L,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;PBST洗涤3次;每孔加入300 μ L含0.5%BSA的PBST,37 $^{\circ}$ C封闭2h;PBST洗涤3次,得到抗原包被板。其中PBST见本实施例标题1中(5)。

[0073] (2) 酶标抗体

[0074] 酶标抗体是浓度为1mg/mL的HRP标记的抗NSs蛋白单克隆抗体2D6D10。使用时,采用PBST按照稀释度为1:1000稀释。

[0075] (3) 阴阳性血清对照

[0076] 阳性血清对照为裂谷热病毒重组NSs蛋白免疫的羊血清,采用实施例2标题3中间接ELISA方法检测,效价达到12800。阴性血清对照为健康山羊血清。

[0077] (4) TMB底物显色液

[0078] TMB底物显色液购自碧云天。

[0079] (5) PBST

[0080] PBST是在pH为7.4浓度为0.01mol/L的PBS缓冲液中添加终浓度(体积百分浓度)为0.5%的吐温-20后得到的。

[0081] (6) 终止液

[0082] 终止液是浓度为2mol/L硫酸溶液。

[0083] 2. 本发明试剂盒的使用方法

[0084] 在抗原包被板的样品孔中,加入采用PBST按照稀释度1:20稀释的待检血清,37 $^{\circ}$ C孵育45min;PBST洗涤3次;每孔加入100 μ L采用PBST按照稀释度为1:1000稀释的HRP-2D6D10,37 $^{\circ}$ C孵育45min;PBST洗涤3次;每孔加入50 μ L TMB底物显色液,显色10min。加入50 μ L浓度为2mol/L硫酸溶液终止反应。阴性对照孔中以阴性血清对照替代待检血清,阳性对照孔以阳性血清对照替代待检血清,其他同样品孔。将终止反应后的抗原包被板置酶标仪读取OD_{450nm}值。根据OD_{450nm}值计算阻断率PI(%), $PI = 100 * (\text{阴性对照孔OD}_{450nm} \text{值} - \text{样品孔OD}_{450nm} \text{值}) / \text{阴性对照孔OD}_{450nm} \text{值}$ 。根据阻断率判断阴阳性。当待检样品的阻断率 $\leq 29.21\%$ 时,该待检样品不含有裂谷热病毒NSs蛋白抗体,即为阴性;当待检样品的阻断率 $\geq 38.82\%$ 时,该待检样品为含有裂谷热病毒NSs蛋白抗体,即为阳性;当待检样品的阻断率大于29.21%且小于38.82%时,为可疑,需要重新进行检验。

[0085] 3. 特异性检验

[0086] 采用本发明试剂盒与ID Vet试剂盒(ID Screen Rift valley fever competition Multi-species)分别对山羊副流感病毒3型阳性血清、蓝舌病病毒阳性血清、口蹄疫病毒阳性血清、绵羊肺炎支原体阳性血清、RVFV N蛋白抗体阳性血清(采用RVFV N蛋白免疫后的山羊血清)进行阻断ELISA方法检测,并设立RVFV NSs蛋白抗体阴性血清、RVFV NSs蛋白抗体阳性血清对照,根据阻断率判定其特异性。结果如表6,前四种血清检测均为阴性;RVFV N蛋白抗体阳性血清检测也为阴性,仅RVFV NSs蛋白抗体阳性血清为阳性;而ID Vet试剂盒检测仅RVFV N蛋白抗体阳性血清为阳性。证明本发明试剂盒具有良好的特异性,且可区分RVFV N蛋白抗体与RVFV NSs蛋白抗体。

[0087] 表6特异性检验

[0088]

参考血清	山羊副流感病毒 3 型	蓝舌病病毒	口蹄疫病毒	绵羊肺炎支原体	RVFV N 蛋白抗体阳性血清	RVFV NSs 蛋白抗体阳性血清
本发明试剂盒阻断率%	17.92	21.82	18.77	31.29	16.27	93.89
判定结果	—	—	—	—	—	+
ID Vet 试剂盒阻断率%	12.45	9.86	16.82	20.65	76.56	23.09
判定结果	—	—	—	—	+	—

[0089] 3重复性检验

[0090] 选取同一本发明试剂盒依照上述检测过程检测3份RVFV NSs蛋白抗体阳性血清、2份RVFVNSs蛋白抗体阴性血清,进行3次重复,计算阻断率和变异系数,检测批内重复性。如表7所示:批内变异系数小于4%。证明本发明试剂盒的批内重复性较好。

[0091] 表7批内重复检验

[0092]

血清样品	重复次数/阻断率 (PI) %			平均值 AV	变异系数 CV%
	1	2	3		
1	1.50	3.92	—2.57	0.95	3.28
2	10.15	4.23	7.97	7.45	2.99
3	90.17	92.30	89.24	90.57	1.57
4	89.24	93.10	89.02	90.45	2.29
5	89.81	92.94	88.17	90.31	2.42

[0093] 选取不同批次本发明试剂盒依照上述检测过程检测3份RVFV NSs蛋白抗体阳性血清、2份RVFV NSs蛋白抗体阴性血清,计算阻断率和变异系数,检测批间重复性。如表8所示:批间变异系数小于6%。证明本发明试剂盒的批间重复性较好。

[0094] 表8批间重复检验

[0095]

血清样品	重复批次/阻断率 (PI) %			平均值 AV	变异系数 CV%
	1	2	3		
1	92.20	90.82	90.51	91.18	0.89
2	79.96	75.22	74.97	76.72	2.81
3	84.39	87.28	78.96	83.54	4.22
4	21.79	14.04	10.24	15.36	5.88
5	10.11	—1.12	5.81	4.93	5.67

SEQUENCE LISTING

<110> 江苏省农业科学院

<120> 一株分泌抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用

<130> 20191230

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 798

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> 裂谷热病毒NSs基因序列

<400> 1

```
atggattact ttcctgtgat atctgttgat ttgcagagtg gtcgtcgtgt tgtgtcagtg 60
gagtacatta aaggtgatgg tcctcccagg ataccttatt ctatggttgg gccctgttgt 120
gtcttttctca tgcaccatcg tcctagtcac gaggttcgct tgcgattctc tgatttctac 180
aatgtcggag aattcccata ccgagtcgga cttggagact ttgcatcaaa cgttgcacct 240
ccaccagcaa agccttttca gagacttatt gatctaatag gccatatgac tcttagtgat 300
ttcacaaggt tccccaatct aaaagaagcc atatcctggc ctcttgaga accctcacta 360
gcttttcttg acctaagctc tactagagtg cacaggaatg atgacattag aagggatcag 420
attgctactc tagcaatgag gagctgcaag attaccaatg atttagaaga ctcctttgtt 480
ggcttacaca ggatgatagt gaccgaggct atcctcagag ggattgacct gtgcctgttg 540
ccaggctttg acctcatgta tgaggttgct cacgtacagt gtgttcggct cctgcaggca 600
gcaagagagg acattttctaa tgctgtagtt ccaaactcag ccctcattgc tcttatggag 660
gagagcctga tgctgcgctc atcacttcct agcatgatgg ggagaaacaa ctggatccca 720
gttggttcctc caatcccaga tgttgagatg gaatcagggg aagagagtga tgatgatgga 780
tttggttgagg ttgattga 798
```

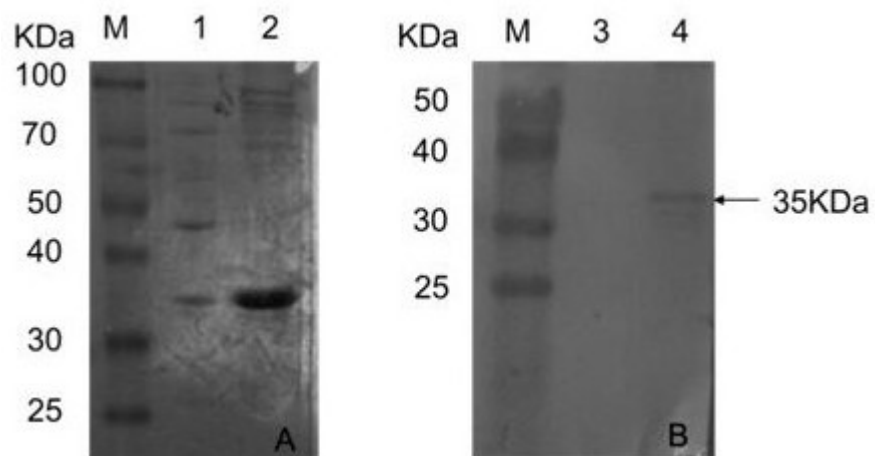


图1

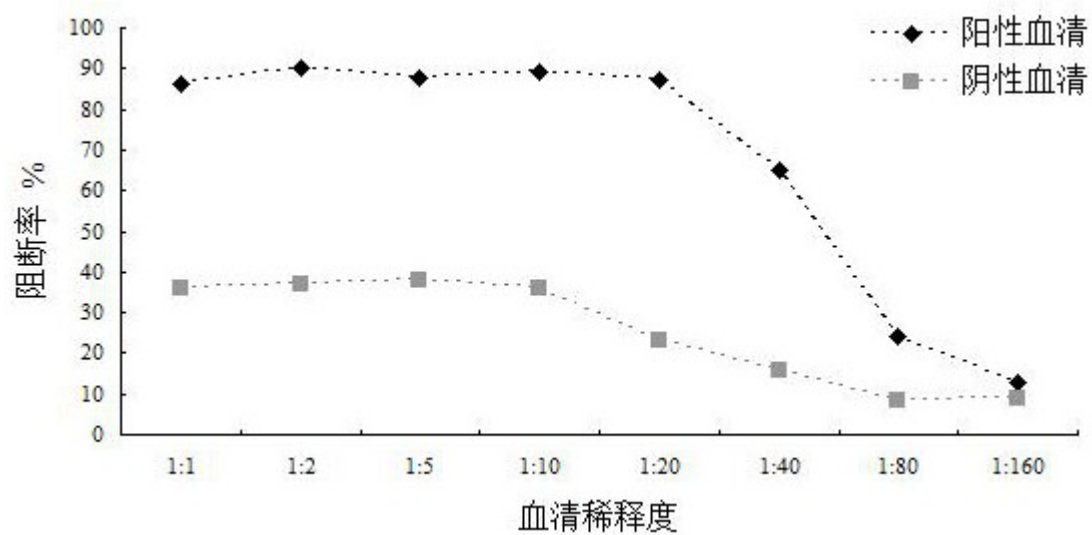


图2

专利名称(译)	一株分泌抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用		
公开(公告)号	CN111041000A	公开(公告)日	2020-04-21
申请号	CN201911407906.4	申请日	2019-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
[标]发明人	李文良 张聪 张纹纹 陈亚玲 杨蕾蕾 毛立 李基棕 孙敏 刘茂军		
发明人	李文良 张聪 张纹纹 陈亚玲 杨蕾蕾 毛立 李基棕 孙敏 刘茂军		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/10 G01N33/68 G01N33/577 G01N33/569 G01N33/535 C12R1/91		
CPC分类号	C07K16/10 G01N33/535 G01N33/56983 G01N33/577 G01N33/68 G01N2333/175		
代理人(译)	袁静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一株分泌抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用，属于生物技术领域。分泌抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株2D6D10，其保藏编号为CCTCC NO：C2019269。本发明还提供所述杂交瘤细胞株分泌的抗裂谷热病毒NSs蛋白单克隆抗体及其在制备裂谷热病毒NSs蛋白抗体检测试剂盒方面的应用。本发明杂交瘤细胞2D6D10能够产生针对RVFV非结构蛋白NSs蛋白的单克隆抗体，该单克隆抗体具有阻断作用，因此本发明的阻断ELISA试剂盒可用于病毒感染与灭活疫苗或缺失疫苗免疫抗体的鉴别诊断。

