



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115819562 B

(45) 授权公告日 2024.12.10

(21) 申请号 202211426483.2

A61K 39/245 (2006.01)

(22) 申请日 2022.11.15

A61P 31/22 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115819562 A

(56) 对比文件
CN 109900902 A, 2019.06.18
CN 113009139 A, 2021.06.22

(43) 申请公布日 2023.03.21

审查员 周洁

(73) 专利权人 北京纳百生物科技有限公司
地址 100176 北京市大兴区北京经济技术
开发区科创十四街11号院3号楼

(72) 发明人 李川敏 杨晓霞 杜锦然 巩玉洁
赵荣茂 李金戈

(51) Int. Cl.

C07K 16/08 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

一种抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的重链和轻链可变区及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的重链和轻链可变区及其应用,所述gB单克隆抗体的Heavy链的基因序列如SEQ ID NO.4所示,其氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示;所述gB单克隆抗体的Kappa链的基因序列如SEQ ID NO.6,其氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示。本发明采用上述的一种抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的重链和轻链可变区,单克隆抗体具有特异性强、灵敏度高等特点,为ELISA试剂盒以及胶体金试纸条的研发推广奠定基础。

Table with 5 columns: Query, Expect, Identifiers, Gap, Strand. It contains sequence alignment data for Mus musculus immunoglobulin heavy chain complex mRNA.

1. 一种抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体,其特征在于:所述gB单克隆抗体包括重链和轻链可变区,gB单克隆抗体的重链的基因序列如SEQ ID NO.4所示、其氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示;gB单克隆抗体的轻链的基因序列如SEQ ID NO.6,其氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示。

2. 一种DNA分子,编码如权利要求1所述的抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体。

3. 一种如权利要求1所述的抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体在制备以gB为靶点的检测试剂或试剂盒中的应用。

一种抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的重链和轻链可变区及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及伪狂犬病病毒技术领域,尤其是涉及一种抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的重链和轻链可变区及其应用。

背景技术

[0002] 猪伪狂犬病(Pseudorabies,PR)是一种由伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)引起的高度传染性疾病。PRV能感染包括猪、羊、牛在内的多种哺乳动物,其中猪最为敏感发病也最为严重。该病以种猪繁殖障碍、成年猪呼吸困难、仔猪死亡为临床特征,给我国养猪业造成了严重的经济损失。

[0003] PRV的发病率和死亡率取决于发病猪的年龄和猪群的免疫状态,免疫接种是预防和控制本病的主要措施。而如何客观有效地评价PRV的抗体水平是科学有效地防控该病的关键之一。

[0004] gB蛋白是PRV增殖的必须的糖蛋白,利用ELISA检测gB抗体是检测PRV抗体水平的重要方式之一。

[0005] 现有国内外技术对PRV的检测主要有荧光PCR法、免疫学分析法(酶联免疫法和胶体金免疫检测法)。荧光PCR仪器价格昂贵,且容易做成污染。酶联免疫吸附试验同样具有特异性强、敏感性高的特点,3~4h内可得出试验结果,并可同时检测大批量样品,广泛用于伪狂犬病的临床诊断。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的重链和轻链可变区及其应用,单克隆抗体具有特异性强、灵敏度高等特点,为ELISA试剂盒以及胶体金试纸条的研发推广奠定基础。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供了一种抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的重链和轻链可变区,所述gB单克隆抗体的Heavy链的基因序列如SEQ ID NO.4所示、其氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示;所述gB单克隆抗体的Kappa链的基因序列如SEQ ID NO.6所示,其氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示。

[0008] 优选地,gB单克隆抗体重链可变区的互补决定区序列分别为CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3,其氨基酸序列分别如SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10所示。

[0009] 优选地,gB单克隆抗体轻链可变区的互补决定区序列分别为CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3,其氨基酸序列分别如SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13所示。

[0010] 一种DNA分子,编码所述的抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的重链和轻链可变区。

[0011] 一种所述的抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的重链和轻链可变区在制备以gB为靶点的检测试剂或试剂盒中的应用。

[0012] 一种所述的抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体在制备以gB为靶点的基因工程抗体或

疫苗中的应用。

[0013] 因此,本发明采用上述一种抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的重链和轻链可变区及其应用,单克隆抗体具有特异性强、灵敏度高等特点,为ELISA试剂盒以及胶体金试纸条的研发推广奠定基础。

[0014] 下面通过附图和实施例,对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

附图说明

[0015] 图1是单克隆抗体重链可变区基因序列比对结果;

[0016] 图2是单克隆抗体重链可变区氨基酸序列比对结果;

[0017] 图3是单克隆抗体轻链可变区基因序列比对结果;

[0018] 图4是单克隆抗体轻链可变区氨基酸序列比对结果。

具体实施方式

[0019] 以下通过附图和实施例对本发明的技术方案作进一步说明。

[0020] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于下述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的主旨或基本特征的情况下,能够以其它的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是下述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内,不应将权利要求中的任何附图标记视为限制所涉及的权利要求。

[0021] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其它实施方式。这些其它实施方式也涵盖在本发明的保护范围内。

[0022] 还应当理解,以上所述的具体实施例仅用于解释本发明,本发明的保护范围并不限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

[0023] 对于本领域的普通技术人员而言,可以根据具体情况理解上述术语在本发明中的具体含义。本发明中使用的术语“约”具有本领域技术人员公知的含义,优选指该术语所修饰的数值在其 $\pm 50\%$, $\pm 40\%$, $\pm 30\%$, $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 范围内。

[0024] 本发明使用的所有术语(包括技术术语或者科学术语)与本发明所属领域的普通技术人员理解的含义相同,除非另外特别定义。还应当理解,在诸如通用词典中定义的术语应当被理解为具有与它们在相关技术的上下文中的含义相一致的含义,而不应用理想化或极度形式化的意义来解释,除非本文有明确地这样定义。

[0025] 对于相关领域普通技术人员已知的技术、方法和设备可能不作为详细讨论,但在适当情况下,所述技术、方法和设备应当被视为说明书的一部分。

[0026] 本发明说明书中引用的现有技术文献所公开的内容整体均通过引用并入本发明中,并且因此是本发明公开内容的一部分。

[0027] 实施例一

[0028] 制备猪伪狂犬病毒抗原

[0029] 一、细胞复苏

[0030] 取冻存的Vero细胞,置于37℃水浴锅中轻轻晃动,使其快速融化,1000r/min离心5min;弃去上清液,加入1mL DMEM(10%HS)重悬细胞,接种于T75培养瓶,补加DMEM(10%HS)至13mL/瓶,37℃细胞恒温培养箱静置培养。

[0031] 二、病毒培养

[0032] 待细胞长满单层后,弃上清,将TPRV毒株用DMEM稀释接种于细胞培养瓶中,置于37℃细胞恒温培养箱中孵育1h,弃上清,加DMEM(10%HS)至15mL继续培养。

[0033] 三、病毒蛋白纯化

[0034] 将接种病毒后CPE达到80%的细胞连同上清放入-70℃冰箱中,反复冻融3次,收集上清,10000r/min离心30min,收集上清到无菌玻璃瓶中。按照1:1000的比例加入灭活剂β-丙内酯,放于4℃冰箱中灭活48h。将灭活后的病毒上清,用Beckman Type45Ti转子,26000r/min超速离心3h,病毒沉淀用6mL无菌PBS重悬,BCA方法测定超离病毒中蛋白浓度为1.5mg/mL,分装后于-70℃冰箱中保存。

[0035] 实施例二

[0036] 制备单克隆抗体

[0037] 一、小鼠免疫

[0038] 取3只6-8周龄的雌性Balb/c小鼠,每只免疫50μg的TPRV病毒。首次免疫时,将TPRV病毒与弗氏完全佐剂做等体积乳化,皮下多点注射免疫小鼠。共免疫三次,每两周免疫一次,二次免疫和三次免疫均用弗氏不完全佐剂进行抗原乳化,免疫剂量和方式不变。三次免疫后一周对小鼠进行尾静脉采血,取血清并测其效价,结果见表1。取100μg的TPRV病毒用1×PBS稀释成200μL,腹腔注射对小鼠进行冲击免疫,三天后可进行细胞融合。

[0039] 表1 小鼠血清效价验证

血清稀释倍数	OD _{450nm}
1 : 10000	1.748
1 : 50000	0.851
1 : 100000	0.549
1 : 500000	0.214
NC	0.14
注: P/N>2.1 为阳性	

[0041] 二、SP2/0骨髓瘤细胞的培养

[0042] 将冻存在液氮中的SP2/0骨髓瘤细胞取出一支,立即将其转移到37℃恒温水浴锅中,不时轻柔晃动冻存管,当细胞融化至半冰晶状态时取出。在无菌环境内操作,把冻存管中的SP2/0细胞转入50mL无菌离心管中,取预热的1640完全培养基10mL缓慢滴加入离心管中,1000r/min离心5min,弃去上清。将细胞团轻柔打散,取5mL培养基重悬细胞并将其转移至T75细胞培养瓶中。另外补加5mL培养基,“十字”方向晃动细胞瓶,放入CO₂细胞培养箱,37℃环境下培养。显微镜观察细胞状态,当密度约为80%时,对SP2/0细胞进行传代培养。

[0043] 三、细胞融合

[0044] (1) 取冲击后的实验鼠进行眼眶采血,收集在EP管中,37℃静置2h后,4000rpm离心10min,收集血清为后续筛选单克隆抗体作为阳性对照使用。小鼠脱颈处死并将其放在75%

酒精中浸泡消毒。

[0045] (2) 脾细胞的制备:在生物安全柜内使用已灭菌的剪刀和镊子剪开小鼠外皮,更换一套新的已灭菌的剪刀镊子剪开小鼠腹腔,再用一套已灭菌的剪刀和镊子小心取出脾脏,剪掉多余的脂肪。准备一支无菌15mL离心管,加入10mLDMEM培养基,将脾脏放入该离心管中,脾脏润湿后小心弃去多余培养基。再吸取10mL的DMEM培养基置于无菌平皿中,用毛玻璃片研磨脾脏,制成单细胞悬液并通过200目尼龙网过滤到无菌离心管中,在50mL无菌离心管中加入30mL的DMEM,用吸管冲洗尼龙网,将装有脾细胞悬液的离心管离心,1500rpm,5min,弃去上清,用手轻轻打散细胞团,再加入30mL DMEM培养基重悬后再离心一次,然后弃去上清,用手轻轻打散细胞团,再加入10mL DMEM培养基重悬。

[0046] (3) 细胞融合:1000rpm,5min离心收集生长良好的SP2/0细胞于50mL离心管中,轻轻打散SP2/0细胞团,加入30mL DMEM培养基重悬,再离心一次后,加入10mL DMEM培养基重悬,再将脾细胞悬液与SP2/0细胞悬液混合,1000rpm离心5min,弃去上清,轻轻打散细胞团。置于37℃水浴环境中,吸取1mL PEG融合剂滴加到离心管中,1min内加完1mL,此时细胞状态为红色均质流沙状,转动管壁感觉像毛玻璃状。

[0047] (4) 终止融合:吸取9mL预热DMEM培养基来终止融合,共分为三个阶段。第一阶段为前1min内滴加1mL,第二阶段为1min内滴加1mL,第三阶段为3min内滴加完剩余的7mL培养基。然后在37℃水浴中静置稳定5min后,800rpm离心5min。

[0048] (5) 铺板:弃去上清,轻轻打散细胞团,加入HAT培养基(例如要铺5块96孔板,200 μ L/孔,除去已提前铺好100 μ L/孔的饲养层细胞,则需要加入50mL的HAT培养基),混匀细胞后,将融合细胞悬液均匀铺于已加入饲养层细胞的96孔细胞板中,100 μ L/孔,放入CO₂细胞培养箱37℃条件下培养。

[0049] 四、阳性杂交瘤细胞的筛选

[0050] 细胞融合后7天,观察到细胞团比较大时,用间接ELISA法对细胞上清进行检测。以100ng/孔TPRV病毒作为检测用的抗原,阳性对照是融合小鼠的血清,阴性对照为PBS免疫小鼠血清。选取显色反应最强的孔检测是否对gB抗体有阻断,以100ng/孔TPRV病毒作为检测用的抗原,一抗为细胞上清,二抗为gB抗体,有阻断的杂交瘤细胞孔确定为阳性孔。将筛选到的阳性杂交瘤细胞进行有限稀释法亚克隆。将亚克隆后鉴定得到的能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株扩大培养,转移至T75细胞瓶中。

[0051] 五、腹水制备

[0052] 将亚克隆后鉴定得到的能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株扩大培养,转移至T75细胞瓶中,培养至细胞数量约80%时,可收集为制备腹水做准备。细胞瓶中加入10mL的无菌1 \times PBS,吹下细胞层,重悬后将其转移到15mL离心管中,1000r/min离心10min。弃掉上清,沉淀另取1mL无菌1 \times PBS重悬混匀,用1mL注射器吸取。每只小鼠注射约500 μ L的细胞悬液,注意小鼠生长状态,一周后待小鼠腹部涨大时方可收集腹水。收集小鼠腹水于离心管中,8000r/min离心20min,吸取中间腹水层。

[0053] 六、单克隆抗体的纯化

[0054] 对收集到的腹水先进行辛酸-硫酸铵法粗纯化,再使用Protein G预装柱对粗纯化的单抗进行二次纯化。

[0055] 实施例三

[0056] 抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的灵敏度及亚类鉴定

[0057] 一、抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的灵敏度

[0058] 采用间接ELISA方法检测纯化后的gB单克隆抗体灵敏度。将TPRV病毒按照100ng/孔进行包被,将1mg/mL的gB单克隆抗体做梯度稀释,验证gB单克隆抗体的灵敏度,结果见表2。gB单克隆抗体的灵敏度为1:100000。

[0059] 表2 单克隆抗体灵敏度验证

[0060]	单抗梯度稀释	OD _{450nm}
	1:500	2.627
	1:1000	2.606
	1:2000	2.36
	1:4000	2.082
	1:6000	1.872
	1:8000	1.614
	1:10000	1.437
	1:50000	0.534
	1:100000	0.247
	NC	0.097

[0061] 二、抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的亚类鉴定

[0062] 使用IgG亚类检测试剂盒(美国Sigma公司)检测抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的亚类,结果见表3。gB单克隆抗体亚类鉴定为IgG2a/Kappa型。

[0063] 表3 单克隆抗体亚型鉴定

单抗名称	重链					轻链	
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c	IgG3	Kappa	Lambda
[0064] gB 单克隆抗体	0.265	1.173	0.332	0.454	0.107	0.696	0.113

[0065] 实施例四

[0066] 单克隆抗体重链和轻链可变区基因克隆

[0067] (1) 杂交瘤细胞培养及总RNA提取

[0068] 用RPMI 1640完全培养基在37℃、5%二氧化碳条件下培养杂交瘤细胞,使细胞数量达到 1×10^7 时用总RNA提取试剂盒(购自天根)提取细胞中的总RNA。

[0069] (2) cDNA第一链的合成

[0070] 使用反转录试剂盒(购自TAKARA),以提取到的总RNA为扩增模板来合成cDNA第一链。

[0071] (3) 基因扩增

[0072] 设计Kappa链,Heavy链的下游引物及上游通用引物。

[0073] 引物:F:AAGCAGTGGTATCAACGCAGA (SEQ ID NO.1)

[0074] Rκ:AACATTGATGTCTTTGGGGTAGAA (SEQ ID NO.2)

[0075] RH:AGGGATCCAGAGTTCCAGGT (SEQ ID NO.3)

[0076] 以cDNA第一链为模板进行PCR扩增,反应体系为50 μ L。模板3 μ L,上游引物(10 μ M) 2.5 μ L,下游引物(10 μ M) 2.5 μ L, 2 \times Taq酶25 μ L,无菌水17 μ L。

[0077] 降落PCR反应条件为:98 $^{\circ}$ C 30s;98 $^{\circ}$ C 15s,64 $^{\circ}$ C-58 $^{\circ}$ C 30s,每次下降0.5 $^{\circ}$ C,直到58 $^{\circ}$ C,循环10次;72 $^{\circ}$ C 30s;98 $^{\circ}$ C 15s,56 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,循环15次;72 $^{\circ}$ C 7min结束程序。

[0078] (4) PCR扩增产物的克隆和筛选

[0079] PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,用PCR产物回收试剂盒(购自天根)回收Kappa链和Heavy链扩增片段,用pLB零背景快速克隆试剂盒(购自天根)将回收纯化的目的片段插入pLB载体中,转化至DH5 α 感受态细胞(氨苄抗性)中,筛选重组阳性克隆并进行测序。

[0080] PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳。

[0081] Heavy链和Kappa链测序结果如下:Heavy链基因为如SEQ ID NO.4所示的序列,其氨基酸为如SEQ ID NO.5所示的序列;Kappa链基因为如SEQ ID NO.6所示的序列,其氨基酸为SEQ ID NO.7所示的序列。

[0082] (5) 可变区氨基酸序列及同源性分析

[0083] 将重链和轻链基因序列和氨基酸序列分别在NCBI数据库中进行比对分析,分析结果显示单克隆抗体重链可变区基因序列与小鼠免疫球蛋白重链可变区(Sequence ID: BC092061.1)同源性最高,同源性为392/441,同源性百分比为89%,结果见图1。

[0084] 单克隆抗体重链可变区氨基酸序列与小鼠免疫球蛋白重链可变区氨基酸序列(Sequence ID: 4PB9_H)同源性最高,同源性为122/145,同源性百分比为84%,结果见图2。

[0085] 单克隆抗体轻链可变区基因序列与小鼠免疫球蛋白Kappa链可变区(Sequence ID: EU159573.1)同源性最高,同源性为326/438,同源性百分比为74%,结果见图3。

[0086] 单克隆抗体轻链可变区氨基酸序列与小鼠免疫球蛋白Kappa链可变区氨基酸序列(Sequence ID: 6X78_A)同源性最高,同源性为140/146,同源性百分比为96%,结果见图4。

[0087] 编码单克隆抗体的重链和轻链可变区的基因序列和氨基酸序列同源性分析结果表明,未发现与本发明相同的序列。此结果与使用IgG亚类检测试剂盒(美国Sigma公司)鉴定单克隆抗体为IgG2a/Kappa相一致。

[0088] (6) CDR区分析

[0089] 将重链可变区和轻链可变区序列,在<https://www.novopro.cn/tools/cdr.html>进行分析,得出其CDR区。

[0090] 抗体重链CDR区:

[0091] CDR-H1:DYNIH(SEQ ID NO.8)

[0092] CDR-H2:YIYPYNGDTAYNQKFKN(SEQ ID NO.9)

[0093] CDR-H3:GNYDYVVDYTM DY(SEQ ID NO.10)

[0094] 抗体轻链CDR区:

[0095] CDR-L1:YLN(SEQ ID NO.11)

[0096] CDR-L2:LVS KLDS(SEQ ID NO.12)

[0097] CDR-L3:WQGTHFPT(SEQ ID NO.13)

[0098] 实施例五

[0099] 制备了猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒,检测了24份猪血清样本,与外购的某公司猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒对比,详细结果见表4。整体阴阳性

样本符合率为96%。

[0100] 表4 样本符合率比对

编号	纳百试剂盒		外购某公司试剂盒	
	OD _{450nm} 值	阴阳性判定	OD _{450nm} 值	阴阳性判定
1#	0.295	+	0.373	+
2#	0.535	+	0.698	+
3#	1.185	-	1.178	-
4#	1.445	-	1.324	-
5#	1.412	-	1.265	-
6#	0.846	+	0.952	+
7#	0.489	+	0.705	+
8#	0.171	+	0.264	+
9#	0.334	+	0.711	+
10#	0.104	+	0.231	+
11#	0.12	+	0.154	+
12#	0.104	+	0.089	+
13#	0.347	+	0.647	+
14#	0.169	+	0.446	+
15#	1.201	-	1.111	疑似
16#	1.307	-	1.208	-
17#	0.2	+	0.393	+
18#	0.109	+	0.151	+
19#	0.097	+	0.28	+
20#	0.078	+	0.102	+
21#	0.185	+	0.256	+
22#	0.092	+	0.288	+
23#	0.087	+	0.118	+
24#	0.092	+	0.267	+
阳性对照	0.074	+	0.077	+
阴性对照	1.517	-	1.612	-

[0102] 注:纳百试剂盒判定标准:阴性对照(N)OD_{450nm}均值-阳性对照OD_{450nm}均值 ≥ 0.3 ;S/N=样品OD_{450nm}均值/阴性对照OD_{450nm}均值;判定标准:S/N > 0.7 ,判断为阴性,说明;0.60 $< S/N \leq 0.7$,判断为可疑;S/N ≤ 0.6 ,判断为阳性。

[0103] 外购某公司猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒判定标准:阴性对照(N)OD_{450nm}均值-阳性对照OD_{450nm}均值 ≥ 0.3 ;S/N=样品OD_{450nm}均值/阴性对照OD_{450nm}均值;判定标准S/N > 0.7 ,判断为阴性,说明;0.60 $< S/N \leq 0.7$,判断为可疑;S/N ≤ 0.6 ,判断为阳性。

[0104] 选取敏感性质控血清样品进行最低检出量研究。研究表明,试制的猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒可以检测到16倍稀释的灵敏度样品;外购的某公司猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒也可检测到16倍稀释的灵敏度样品。详细结果见表5。由此结果说明,试制的猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒具有良好的敏感性。

[0105] 表5 敏感性质控品检测结果

	纳百试剂盒		外购某公司试剂盒	
	OD _{450nm}	S/N	OD _{450nm}	阴阳性判定
[0106] 2 倍	0.116	9%	0.185	+
4 倍	0.147	11%	0.212	+
8 倍	0.289	22%	0.263	+
16 倍	0.575	43%	0.661	+
32 倍	0.948	71%	0.987	-
64 倍	1.11	83%	1.089	-
128 倍	1.221	91%	1.254	-
PC	0.109	8%	0.115	+
NC	1.343	100%	1.324	-

[0107] 用试制的猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒和外购的某公司猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒分别检测5份阴性样品,结果均为阴性,见表6。由此可以表明,试制的猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒具有良好的特异性。

[0108] 表6 特异性质控品检测结果

	纳百试制试剂盒		外购某公司试剂盒	
	OD _{450nm}	S/N	OD _{450nm}	阴阳性判定
[0109] TY-1	1.414	96.98%	1.188	阴性
TY-2	1.326	90.95%	1.173	阴性
TY-3	1.459	100%	1.166	阴性
TY-4	1.284	88.07%	1.241	阴性
TY-5	1.429	98.01%	1.182	阴性
阳性对照	0.261		0.217	
阴性对照	1.458		1.438	

[0110] 因此,本发明采用上述一种抗猪伪狂犬病毒gB单克隆抗体的重链和轻链可变区及其应用,单克隆抗体具有特异性强、灵敏度高等特点,为ELISA试剂盒以及胶体金试纸条的研发推广奠定基础。

[0111] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对其进行限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而这些修改或者等同替换亦不能使修改后的技术方案脱离本发明技术方案的精神和范围。

Mus musculus immunoglobulin heavy chain complex, mRNA (cDNA clone MGC:102662 IMAGE:4020466), complete cds
 Sequence ID: [BC092061.1](#) Length: 1629 Number of Matches: 1

Range 1: 153 to 590 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [Related Information](#)
[GEO Profiles - microarray expression data](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
556 bits(516)	9e-154	392/441(89%)	9/441(2%)	Plus/Plus
Query 1	AMGKCTTGGATACAAATGACTGACTACACATGACTGGTGAATTTGACCTTGGG	60		
Sbjct 153	AMPKCTTGGATACAAATGACTGACTACACATGACTGGTGAATTTGACCTTGGG	212		
Query 41	AMGKCTTGGATGAGTATGATATTAATTAATCTTCAATGCTGACTGCTCAACAG	120		
Sbjct 213	AMGKCTTGGATGAGTATGAAATATTAATCTTCAACATGCTGACTGCTCAACAG	272		
Query 121	AMGTCAGAACAGGCCACATGACTGACTGCTTCCCGACAGCTACATGGAC	180		
Sbjct 273	AMGTCAGAACAGGCCACATGACTGACTGAGAGGCTTCCCGACAGCTACATGGAC	332		
Query 161	CTCCGACCTGACATCTGAGGACTCTGACTTACTCTGACAGGAGAA-CTA-T	237		
Sbjct 333	CTCCGACCTGACATCTGAGGACTCTGACTTACTCTGACAGGAGAAATGAAAT	382		
Query 230	GATTACDTCG-AGA-CTACTATGACTCTGGGTCAGGAACTGACTGACTG	294		
Sbjct 393	TATA-TACTACGATGAACTCTGACTCTGGGTCAGGAACTGACTGACTG	449		
Query 295	TCTTCAGTAAACAAAGCCATGCTTATCTGACTGAGGCTCTGCTGGAGATACA	354		
Sbjct 460	TCTTCAGTAAACAAAGCCATGCTTATCTGACTGAGGCTCTGCTGGAGATACA	609		
Query 388	ACTGACTCTGCTGACTTGGAGCTGCTGAGGCTTATCTGACTGAGGCTGACT	414		
Sbjct 540	ACTGACTCTGCTGACTTGGAGCTGCTGAGGCTTATCTGACTGAGGCTGACT	569		
Query 415	TTGACTGAGACTTGGATCC	435		
Sbjct 570	TTGACTGAGACTTGGATCC	590		

图1

Chain H, Ab64 heavy chain [Mus musculus]
 Sequence ID: [4PB9_H](#) Length: 222 Number of Matches: 1

Range 1: 23 to 167 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
217 bits(553)	1e-68	Compositional matrix adjust.	122/145(84%)	127/145(87%)	0/145(0%)
Query 1	KASGVIITDHIHVVKLSLGRSLVIGIIFPNQDTAYWQRFERKALIVTSSRTAMD	60			
Sbjct 23	KASGI + TDFH + HWK S QSLSLVIGIIFPNQD + FWRKFK KATLTVD SS TA + H	82			
Query 61	LRSLTSDSAVYTCARNTDVFVDMVYGGIstvtssakttapsvYFLAPVCGDITG	120			
Sbjct 83	L SLTSDSAVYTCAR Y Y Y MDVYGGIstvtssakttapsvYFLAPVCGDITG	142			
Query 121	SSVTLACLWYGFPEFVTLWNSGS	145			
Sbjct 143	SSVTLACLWYGFPEFVTLWNSGS	167			

图2

Mus musculus cell-line ACC4 hybridoma immunoglobulin kappa light chain mRNA, partial cds
 Sequence ID: [EU159573.1](#) Length: 657 Number of Matches: 1

Range 1: 109 to 546 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
284 bits(314)	8e-72	326/438(74%)	3/438(0%)	Plus/Plus
Query 1	TATCTGAACCTGGCTGATTCAGCGCCCGGGCCAGAGCCGAAAGCCCTGATTTATCTGGTG	60		
Sbjct 109	TATTTGAATGGTGTGTACAGAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCTAAATCTATCTGGTG	168		
Query 61	AGCAAACTGGATAGCGGGTCCCGGATGCTTTACDGGGAGCGGCGACCGGATTTT	120		
Sbjct 169	TCTAAACTGGACTCTGGGTCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTC	228		
Query 121	ACCTGAAAATAGCGGGTGGAGCGGAAATCTGGCGGTGATTAITGCTGGCAGGGC	180		
Sbjct 229	ACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGCTGAGGATTTGGGATTTATTAITGCTGGCAGGGT	288		
Query 181	ACCCATTTTCCG-ACCTTGGCGGGGACDAAACTGGAACTGAAAGCGCGGATGCG	237		
Sbjct 289	ACACATTTTCCGCTCACGTTGGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGCGGCTGATGCT	348		
Query 236	CGCCGACCGTGAGCAITTTTCCCGGAGCGAGCAAGCTGACCAAGCGGGCGCGGAGC	297		
Sbjct 349	GCACCACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAATTAACATCTGGAGTGCCTCA	406		
Query 296	GTGGTGTCTTCTGAACAATTTTATCCGAAAGATTAACGTGAAATGGAAAATTGAT	357		
Sbjct 409	GTGGTGTCTTCTGAACAATTTTATCCGAAAGATTAACGTGAAATGGAAAATTGAT	468		
Query 356	GGCAGCAAGCCAGAAAGCGGCTGCTGAAACAGCTGAGCGGATCAAGATAGCAAGATAGC	417		
Sbjct 469	GGCAGTGAAGCAAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAGAGCAGC	528		
Query 418	ACCTATAGCATGAGCAGC	435		
Sbjct 529	ACCTACAGCATGAGCAGC	546		

图3

Chain A, antibody vFP48.03 light chain [Mus musculus]
 Sequence ID: **6X78_A** Length: **219** Number of Matches: **1**
[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 37 to 182 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
293 bits(750)	7e-99	Compositional matrix adjust.	140/146(96%)	143/146(97%)	1/146(0%)
Query 1	YLWLLIQRPQGSPEKLIYLVSKLDSGYDFRFTGSGSGTDFILKISRVEADLGYYTCWQG				60
Sbjct 37	YLWLL+QRPQGSPEKLIYLVSKLDSGYDFRFTGSGSGTDFILKISRVEADLGYYTCWQG				96
Query 61	THFF-TPGACTLELRKADAAFTVSIFFPSSBQLTSGGASVVCFLMNFYFKDINVKWKID				119
Sbjct 97	THFF TPG GT+LE+EK DAAFTVSIFFPSSBQLTSGGASVVCFLMNFYFKDINVKWKID				156
Query 120	GSERQNGVLNSWTDQDSKDSYMSSS				145
Sbjct 157	GSERQNGVLNSWTDQDSKDSYMSSS				182

图4