



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115991765 B

(45) 授权公告日 2024.03.01

(21) 申请号 202211133538.0

(22) 申请日 2022.09.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115991765 A

(43) 申请公布日 2023.04.21

(83) 生物保藏信息
CCTCC NO: C2022187 2022.06.20

(73) 专利权人 扬州大学
地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72) 发明人 吴慧光 李晨 陈振海 牟春晓
赵静雯

(74) 专利代理机构 北京思元知识产权代理事务
所(普通合伙) 11598
专利代理师 余光军 霍雪梅

(51) Int. Cl.
C07K 16/10 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
C12N 15/50 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 109796531 A, 2019.05.24

CN 113150134 A, 2021.07.23

CN 114057868 A, 2022.02.18

CN 113604439 A, 2021.11.05

史继亚.猪δ冠状病毒S蛋白和M蛋白单克隆抗体的制备.中国学位论文全文数据库.2017,全文.

王先松等.猪Delta冠状病毒病的诊断与防控研究进展.中国兽医杂志.2020,第56卷(第03期),第79-82页.

董建国等.猪德尔塔冠状病毒研究进展.广东农业科学.2019,第46卷(第03期),第113-118页.

审查员 陈茹

权利要求书1页 说明书8页
序列表(电子公布) 附图3页

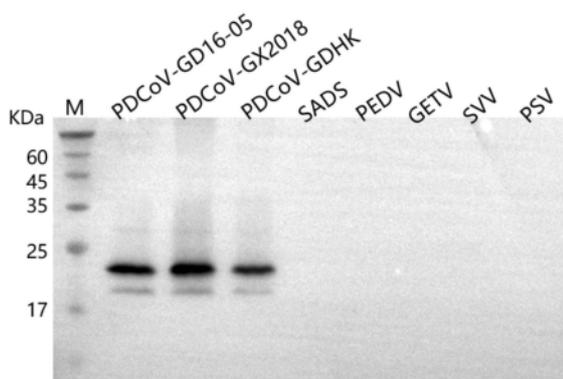
(54) 发明名称

抗猪δ冠状病毒M蛋白单克隆抗体及其识别的抗原表位肽和应用

(57) 摘要

本发明公开了抗猪δ冠状病毒M蛋白单克隆抗体及其识别的抗原表位肽和应用。本发明通过截短猪δ冠状病毒M基因使其有利于与pCold-TF带有担体蛋白的质粒在宿主大肠杆菌中形成易于表达的、利于小鼠产生免疫原性的融合蛋白，经过细胞融合、筛选和亚克隆获得分泌抗猪δ冠状病毒M蛋白的单克隆杂交瘤细胞株以及由该细胞株分泌的抗猪δ冠状病毒M蛋白单克隆抗体。本发明提供的单克隆抗体能够特异识别猪δ冠状病毒的M蛋白，与其他冠状病毒没有交叉反应。本发明进一步提供了该单克隆抗体识别的抗原表位肽，其氨基酸序列为SPESRL所示，其具有良

好特异性。本发明提供的单克隆抗体或其识别的抗原表位肽能应用于检测或诊断猪δ冠状病毒。



CN 115991765 B

1. 抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体,其特征在于,其重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO.2所示;其轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO.3所示。

2. 一株分泌抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其特征在于,其保藏编号为CCTCC NO.C2022187。

3. 一种缀合物,其特征在于,由权利要求1所述单克隆抗体与酶相、放射性同位素或化学发光化合物中的一种或多种相偶联得到。

4. 检测猪 δ 冠状病毒的检测试剂盒,包括检测抗体;其特征在于,所述的检测抗体是权利要求1所述的单克隆抗体。

5. 权利要求1所述的单克隆抗体、权利要求2所述的杂交瘤细胞株或者权利要求3所述的缀合物在制备诊断猪 δ 冠状病毒试剂中的应用。

抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体及其识别的抗原表位肽和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗冠状病毒单克隆抗体,尤其涉及抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体及其识别的抗原表位肽以及分泌该单克隆抗体的杂交瘤细胞株,本发明还涉及它们在制备诊断或防治猪 δ 冠状病毒的试剂或药物中的应用,属于抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体及其应用领域。

背景技术

[0002] 自2003年SARS-CoV爆发以来,冠状病毒受到了人们的广泛关注,越来越多的新型冠状病毒被发现,严重威胁动物与人类的健康并给各养殖行业造成了严重的经济损失。冠状病毒为单股正链RNA病毒,分为 α 、 β 、 γ 、 δ 四个属,猪 δ 冠状病毒(Porcine Deltacoronavirus, PDCoV)是一种新型猪肠道冠状病毒,属于 δ 冠状病毒属。猪 δ 冠状病毒基因组大小约为25-30kb,编码纤突(S)蛋白、囊膜(E)蛋白、膜(M)蛋白、核衣壳(N)蛋白四种结构蛋白。

[0003] 猪 δ 冠状病毒感染主要影响仔猪,被感染后出现严重的萎缩性肠炎并伴有严重腹泻、呕吐等症状,可导致死亡。猪 δ 冠状病毒也会在不同物种间传播,研究表明,犊牛也对其易感,最近首次报道了一例人感染猪 δ 冠状病毒的情况。迄今为止,对猪 δ 冠状病毒M蛋白的功能研究知之甚少。因此,针对猪 δ 冠状病毒的M蛋白提供一种单克隆抗体及分泌其抗体的杂交瘤细胞系,这对于猪 δ 冠状病毒感染的诊断或防治尤为重要。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一是提供抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体。

[0005] 本发明的目的之二是提供分泌所述抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0006] 本发明的目的之三是提供所述抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体识别的抗原表位肽。

[0007] 本发明的目的之四是将所述的抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体或其识别的抗原表位应用于制备诊断或治疗由猪 δ 冠状病毒所导致疾病的试剂或药物中的应用。

[0008] 本发明的上述目的是通过以下技术方案来实现的:

[0009] 本发明的一方面是提供了抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体,该单克隆抗体的重链可变区的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别为SYTFSDYA、ISPYYGNS和A所示;单克隆抗体的轻链可变区的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别为KSVSTSGYSYL、VS和QHIREL所示。

[0010] 进一步优选的,所述抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO.2所示,其编码基因的核苷酸序列为SEQ ID NO.4所示;轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO.3所示,其编码基因的核苷酸序列为SEQ ID NO.5所示。

[0011] 本发明所提供的抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体只能特异性识别PDCoV的M蛋白,

与其他冠状病毒没有交叉反应,因此可作为检测抗体诊断或检测猪 δ 冠状病毒。

[0012] 作为一种应用所述抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体检测猪 δ 冠状病毒的参考实施方式,本发明提供了一种检测猪 δ 冠状病毒的ELISA检测试剂盒,包括:一抗,酶标记的二抗,抗体稀释液、洗涤液、封闭液,显色液;其中,所述的一抗或二抗是本发明的抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体。

[0013] 本发明的另一方面是提供抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体识别的抗原表位肽,其氨基酸序列为SPESRL所示;相应的,编码所述抗原表位肽的基因以及含有该基因的重组表达载体和重组宿主细胞等也属于本发明的保护范围;其中,所述的重组表达载体可以是重组原核表达载体或者是重组真核表达载体;所述的重组宿主细胞为重组原核表达细胞、重组真核表达细胞,重组真菌细胞或重组酵母细胞;所述重组原核表达细胞优选大肠杆菌。

[0014] 本领域技术人员可按照本领域常规的方法将所述重组载体转化、转导或者转染到宿主细胞中,如氯化钙法化学转化、高压电击转化,优选电击转化;可以使用本领域常用的方法从重组宿主细胞中分离和纯化所述抗原表位肽。例如,离心分离培养基和重组宿主细胞,高压匀浆破碎细胞、离心过滤去除细胞碎片,亲和层析纯化抗原表位肽。对于分离纯化所得的抗原表位肽的产物,可以使用本领域常用的方法进行纯度鉴定。

[0015] 本发明所提供的抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体识别的抗原表位肽具有良好的特异性和免疫原性,可作为检测试剂应用于猪 δ 冠状病毒的诊断或检测。

[0016] 作为一种应用所述抗原表位肽检测猪 δ 冠状病毒的参考实施方式,本发明提供了一种检测猪 δ 冠状病毒的检测试剂盒,包括:包被抗原,一抗,酶标记的二抗,阳性对照血清,阴性对照血清,抗体稀释液、洗涤液、封闭液,显色液;其中,所述的包被抗原是本发明提供的抗原表位肽,所述的一抗是本发明提供的抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体。

[0017] 本发明更进一步将所述单克隆抗体与酶相(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、放射性同位素、荧光化合物或化学发光化合物中的一种或多种相偶联得到缀合物,这些缀合物也可用于猪 δ 冠状病毒的诊断或检测。

[0018] 本发明的第三方面是提供一株分泌所述抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株PDCoV-M-24-A6,其保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为:中国武汉武汉大学,保藏编号为:CCTCCNO:C2022187,保藏时间为:2022年6月20日。

[0019] 本发明进一步提供了构建所述杂交瘤细胞株PDCoV-M-24-A6的方法,该方法包括:

[0020] (1) 根据M基因的亲疏水性将跨度较大的区域截除,选择跨度较小的区域进行截短获得截短的猪 δ 冠状病毒M基因与TF担体蛋白编码基因融合构建原核重组表达载体,经过表达纯化得到重组蛋白。

[0021] (2) 将重组蛋白与弗氏佐剂等体积混合制备得到免疫原,按照免疫程序免疫小鼠。

[0022] (3) 取免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤(sp2/0)细胞进行融合,融合后经过筛选与亚克隆最终得到分泌抗猪 δ 冠状病毒M蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0023] 本发明中所述截短的猪 δ 冠状病毒M基因因为其蛋白序列(M蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO.1)的第80位至217位氨基酸对应的核苷酸序列。

[0024] 本发明通过优化截短M基因蛋白使其有利于与pCold-TF带有担体蛋白的质粒在BL21(DE3)宿主大肠杆菌中形成易于表达的、利于小鼠产生免疫原性的融合重组蛋白,经过SDS-PAGE电泳切胶纯化后,免疫小鼠,再经过细胞融合、筛选和亚克隆最终获得一株分泌抗

猪 δ 冠状病毒M蛋白的单克隆杂交瘤细胞株以及由该细胞株所分泌的单克隆抗体。本发明所提供的单克隆抗体具有高特异性等特点,经过IFA与Western blot结果显示,本发明提供的单克隆抗体能够特异识别猪 δ 冠状病毒的膜M蛋白,与其他冠状病毒没有交叉反应。因此,本发明提供的单克隆抗体及其识别的抗原表位肽可用于检测或诊断猪 δ 冠状病毒。

[0025] 本发明所涉及的术语定义

[0026] 术语“重链可变区”和“轻链可变区”,在免疫球蛋白的H和L链的近N端约有110个氨基酸序列的变化很大,其他部分的氨基酸序列相对恒定,据此可将轻链和重链区分为可变区(V)和恒定区(C)可变区内包含超变区HVR(hypervariable region)或称互补决定区CDR(Complementarity-determining region)与FR骨架区。

[0027] 术语“氨基酸序列”是指氨基酸相互连接形成肽链(或多肽)的顺序,氨基酸序列只能按照一个方向读取。氨基酸有100多种不同类型,其中20种常用,本发明不排除氨基酸链上有其他物质,例如糖类、脂类等修饰,本发明也不限于20中常用的氨基酸。

[0028] 术语“核苷酸序列”或“多核苷酸序列”是指DNA或RNA中碱基的排列顺序,即在DNA中为A、T、G、C的排列顺序,或者在mRNA中A、U、G、C的排列顺序,也包括rRNA、tRNA、mRNA中碱基的排列顺序。应该理解,本发明请求保护的抗体基因除了DNA序列外,也涵盖RNA(rRNA、tRNA、mRNA)以及它们的互补序列。

[0029] 术语“重组表达载体(Expression vectors)”是指在克隆载体基本骨架的基础上增加表达元件(如启动子、RBS、终止子等),使目的基因能够表达的载体。表达载体四部分:目的基因、启动子、终止子、标记基因。本发明包括但不限于原核细胞表达载体、真核细胞表达载体或其它细胞表达载体。

[0030] 术语“宿主细胞”或“重组宿主细胞”意指包含本发明多核苷酸的细胞,而不管使用何种方法进行插入以产生重组宿主细胞,例如直接摄取、转导或所属技术领域中的其它方法。

附图说明

[0031] 图1为M基因的亲疏水性分析结果;其中,横轴表示氨基酸数量,纵轴以0为界限,<0表示亲水,>0表示疏水。

[0032] 图2为重组蛋白的表达与纯化结果;其中,M为相对分子质量标准,单位kDa,1、2、3、4、5、6分别代表pCold-TF菌液(对照)、pCold-TF-M重组蛋白菌液、pCold-TF-M重组蛋白上清、pCold-TF-M重组蛋白沉淀、纯化后的pCold-TF-M重组蛋白、pCold-TF-M重组蛋白菌液(对照)。

[0033] 图3为单克隆抗体的IFA检测结果图;其中,PDCoV接种LLC-PK1细胞后出现特异性荧光(图3B),而没有接种PDCoV的细胞则没有荧光出现(图3A);PEDV接种vero细胞,以本发明人实验室保存的PEDV N蛋白单抗作为阳性对照,没有出现特异性荧光(图3C),而PDCoV M蛋白单抗有荧光显现(图3D)。

[0034] 图4为单克隆抗体的Western blot图;其中,M为相对分子质量标准,单位kDa,泳道1为PDCoV感染LLC-PK1的总蛋白,泳道2为未感染PDCoV的LLC-PK1总蛋白(对照)。结果显示,泳道1出现了M蛋白的特异性条带,大小为24.6kDa,对照没有任何条带出现。

[0035] 图5为单克隆抗体抗原表位鉴定的Western blot结果图;M为相对分子质量标准,

单位kDa,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13分别对应左图的氨基酸片段,结果显示,该抗原表位最终定位于片段12,其氨基酸序列为SPESRL。

[0036] 图6为单克隆抗体的特异性鉴定结果;鉴定结果表明该单克隆抗体只特异性识别PDCoV。

具体实施方式

[0037] 以下结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0038] 本发明中所用到的各种溶液和培养基的配制

[0039] 1.溶液的配制

[0040] 磷酸盐缓冲液(PBS):称取氯化钠8g、氯化钾0.2g、磷酸氢二钠1.42g和磷酸二氢钾0.27g,溶于800ml蒸馏水中,调pH至7.4,定容至1L。

[0041] 4%多聚甲醛溶液:称取4g多聚甲醛粉末溶于100ml PBS中。

[0042] 0.1% Triton X-100溶液:吸取10 μ l Triton X-100稀释于10ml PBS中2%BSA溶液:称取2g BSA粉末溶于100ml PBS中。

[0043] 试剂:50% PEG1500(Sigma公司)。

[0044] 2.培养基的配制

[0045] LB培养基:称取Tryptone 10g、Yeast Extract 5g和NaCl 10g,溶于800ml蒸馏水中,定容至1L。

[0046] HAT培养基:2%的50 \times HAT(北京博奥龙公司)、12%的胎牛血清(Sigma公司)、1%的100 \times 青链霉素(索莱宝公司)和85%的DMEM(Gibco公司)。

[0047] HT培养基:2%的50 \times HT(北京博奥龙公司)、12%的胎牛血清、1%的100 \times 青链霉素和85%的DMEM。

[0048] LLC-PKI培养基:10%的胎牛血清、1%的1M HEPES溶液与100 \times 青链霉素、88%的MEM。

[0049] 冠状病毒培养基:10%的胰蛋白胍磷酸盐肉汤(TPB)、0.0002%的胰酶、1%的100 \times 青链霉素和89%的DMEM。

[0050] 实施例1杂交瘤细胞株的构建以及抗猪 δ 冠状病毒M蛋白的单克隆抗体的筛选和鉴定

[0051] 1.抗原的制备

[0052] 重组蛋白的获取与制备

[0053] 猪 δ 冠状病毒M基因(猪 δ 冠状病毒M蛋白的氨基酸序列为SEQ ID No.1所示)的选取与合成:根据GenBank中猪 δ 冠状病毒毒株CHN-GD16-05全基因组查找M基因序列,将M基因中亲疏水性跨度较大的区域截除,选择跨度较小的区域进行截短获得截短后的猪 δ 冠状病毒M基因与TF担体蛋白编码基因融合构建原核重组表达载体,具体方法如下:

[0054] 选取M基因序列设计一对特异性引物PDCoV-M-F与PDCoV-M-R,并在其上下游分别插入酶切位点EcoRI与HindIII。

[0055] PDCoV-M-F 5' -3' :atccgaattcatatcctgggccaagtac;

[0056] PDCoV-M-R 5' -3' :tcgacaagctttttacatatacttatacaggc (下划线为酶切位点)。

[0057] 进一步地,进行RT-PCR扩增,先将CHN-GD16-05株病毒RNA基因组反转录为cDNA,进一步的地,根据设计的引物扩增M截短基因。

[0058] PCR反应体系总体积为50 μ l:

[0059] ddH₂O:21 μ l

[0060] PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase:25 μ l

[0061] PDCoV-M-F:1 μ l

[0062] PDCoV-M-R:1 μ l

[0063] cDNA (PDCoV) :2 μ l

[0064] 反应条件:98 $^{\circ}$ C预变性3min;98 $^{\circ}$ C变性15s、55 $^{\circ}$ C退火10s、72 $^{\circ}$ C延伸30s,此步骤进行30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。进一步的通过PCR纯化试剂盒 (Omga公司) 进行PCR纯化,进一步的进行核酸电泳并使用胶回收试剂盒 (Omga公司) 回收核酸,进行酶切处理。

[0065] M基因进行EcoRI与HindIII限制性内切酶(宝日医生物技术公司)酶切处理后,连接到带有对应酶切位点的pCold-TF质粒载体中构建原核表达载体,经PCR鉴定或酶切鉴定构建成功后,将重组质粒转入BL21 (DE3) 大肠杆菌菌种中,挑取单个克隆菌群接种于LB培养基中,待OD值达到0.5左右,加入IPTG进行诱导表达,置于16 $^{\circ}$ C恒温箱持续培养8-12h。离心收集细菌进行超声破碎,破碎后收集上清进行SDS-PAGE分析,该蛋白在目标大小位置出现特异性条带,最后通过切胶纯化大量目的蛋白。

[0066] 2. 小鼠免疫

[0067] 获得PDCoV-M重组蛋白之后,1:1等体积与弗氏完全佐剂(Sigma公司)混合,放入两颗研磨珠于震荡研磨机中震荡研磨使其变为白色粘稠液体,200 μ l/80 μ g蛋白的剂量皮下多点注射6-8周龄BALB/c小鼠,间隔14d,进行第二次免疫,重组蛋白1:1等体积与弗氏不完全佐剂混合,200 μ l/80 μ g蛋白的剂量皮下多点注射;间隔14d,进行第三次免疫,免疫策略同第二次相同;7-10d,小鼠眼眶静脉丛采血,若抗体效价达到1:1000则间隔3周后进行冲击免疫,直接腹腔注射200 μ l/80 μ g蛋白原液。

[0068] 3. 细胞融合

[0069] 饲养细胞的准备:将小鼠脱颈致死,浸泡于75%的酒精中5min,于生物安全柜中剪开腹部皮肤,暴露其腹腔,用灭菌注射器吸取8ml HAT培养基,注入小鼠腹腔,轻柔按摩其腹部几下,将液体回抽,与HAT培养基混合均匀总体积为36ml,铺于3块24孔板,每孔500 μ l。

[0070] 脾细胞的准备:冲击免疫3d后,无菌操作取小鼠的脾脏于2ml DMEM培养基中,用注射器针头多次戳扎脾脏,直至脾脏的细胞全部释放出来,收集液体于50ml离心管中补加DMEM到20ml离心收集脾细胞。

[0071] 骨髓瘤(sp2/0)细胞的准备:将骨髓瘤(sp2/0)细胞收集到50ml离心管中,用DMEM离心清洗一次。

[0072] 细胞融合开始前所用到的培养基与试剂等均放到37 $^{\circ}$ C温箱中预热。

[0073] 细胞融合:将骨髓瘤(sp2/0)细胞与脾细胞个数按1:5充分混合于50ml离心管中,离心弃掉上清只保留细胞,轻轻拍打管壁底部,使其均匀分散到管壁底部四周,将离心管置于37 $^{\circ}$ C烧杯中,缓慢旋转管壁并逐滴加入1ml 50% PEG1500,1min内加完;继续旋转管壁

20s;逐滴加入2ml DMEM,2min内加完;补加DMEM至20ml,1000r/min离心10min,弃掉上清,用HAT培养基轻轻重悬底部细胞并补加至36ml,铺于事先加好饲养细胞的3块24孔板,每孔500 μ l。置于37 $^{\circ}$ C、含有5% CO₂的细胞培养箱中培养。

[0074] 4. IFA筛选与亚克隆

[0075] 第5天、第7天用HAT培养基进行半换液,第8天、第9天待细胞长满孔底2/3进行IFA检测阳性孔。确定阳性孔后,改用HT培养基将该孔细胞扩大培养并进行亚克隆。亚克隆步骤为细胞计数并取约500个细胞稀释到20ml预先加入饲养细胞的HT培养基中混合均匀,每孔100 μ l铺于2块96孔板。待细胞生长到孔底面积的50%时,吸取50 μ l单个克隆孔的上清进行IFA检测。阳性孔再进行一轮亚克隆,方法同上。

[0076] 5. 腹水的制备

[0077] 单克隆阳性孔杂交瘤细胞扩大培养后,收集约 2.5×10^6 个细胞,用500 μ l DMEM重悬细胞,注射于事先打过液体石蜡小鼠的腹腔。7d后,小鼠腹部明显膨大,针头穿刺收集腹水于10ml离心管中,1500g离心10min,保留上清分装后于-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱中保存。

[0078] 6. 单克隆抗体的IFA检测

[0079] 将PDCoV-M-24-A6单抗每次倍比稀释后分别与包被的抗原反应,之后加入带有Dylight 488标记的山羊抗鼠IgG二抗(Abcam公司)于倒置荧光显微镜下观察结果,并通过计算机荧光采集系统拍摄结果并保存。结果显示该抗体在1:2000倍内稀释荧光效果最好,最高稀释倍数可达到1:16000倍,阴性对照组无荧光显示。

[0080] 收集的腹水抗体应用于IFA,具体如下:

[0081] 细胞铺板:将LLC-PKI细胞铺于96孔板,置于37 $^{\circ}$ C含5%CO₂的温箱中培养12-24h,待细胞长满孔底。

[0082] 病毒接入:将96孔板中原培养基上清弃掉,每孔100 μ l PBS清洗两遍,加入预先稀释好病毒原液的冠状病毒培养基,每孔50 μ l,置于37 $^{\circ}$ C含5%CO₂的温箱中培养12-24h细胞约半数死亡,收板。

[0083] 抗原包被:

[0084] 弃掉病毒培养基;

[0085] 4%多聚甲醛固定15min,每孔50 μ l;

[0086] 0.1% TritonX-100通透30min,每孔50 μ l;

[0087] 2%BSA封闭30min,每孔50 μ l。

[0088] 一抗孵育:每孔加入PBS或1:2000稀释的PDCoV-M-24-A6单抗50 μ l作为一抗,室温孵育2h。

[0089] 二抗孵育:每孔加入50 μ l 1:2000稀释的Dylight 488标记的山羊抗鼠IgG为二抗,室温孵育1h。

[0090] 以上每步结束后均需PBS洗2遍,每次2min,最后1遍拍干即可,于倒置荧光显微镜下拍照观察结果,结果见图3。

[0091] 根据图3的结果可见,用PDCoV-M-24-A6单抗作为一抗,PDCoV接种的LLC-PKI细胞出现特异性荧光(图3B),而没有接种PDCoV的细胞则没有荧光出现(图3A);以本发明人实验室保存的PEDV N蛋白单抗作为一抗(阳性对照),PEDV接种的vero细胞没有出现特异性荧光(图3C),而以PDCoV-M-24-A6单抗作为一抗,PEDV接种的vero细胞有荧光显现(图3D),说明

本发明制备的单抗只特异性识别PDCoV,与PEDV没有交叉反应,具有良好的特异性。

[0092] 试验例1单克隆抗体的Western blot检测

[0093] 分别取制备的猪δ病毒感染与未感染细胞的样品,进行SDS-PAGE蛋白电泳。电泳结束后将凝胶上的条带转移至PVDF膜上。用5%的脱脂奶粉溶液封闭2小时;加入1:1000倍稀释的由PDCoV-M-24-A6杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体,4℃孵育过夜;加入1:8000倍稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG二抗(Abcam公司),室温摇床孵育1h;以上每步结束后都需要用TBST溶液清洗2遍,每次10min。最后加入发光液(新赛美公司)通过计算机显色于凝胶成像系统拍照保存,Western blot检测结果见图4。

[0094] 根据图4的检测结果可见,泳道1出现了M蛋白的特异性条带,大小为24.6kDa,对照没有任何条带出现,证明本发明制备的单克隆抗体能够特异性识别PDCoV M蛋白。

[0095] 试验例2单克隆抗体的抗原表位鉴定、以及轻重链可变区序列测定

[0096] 1单克隆抗体的抗原表位鉴定

[0097] 将PDCoV M蛋白的第80-217位氨基酸残基截成5个多肽片段,其中,多肽片段1为第80-115位氨基酸残基,多肽片段2为第94-142位氨基酸残基,多肽片段3为第123-168位氨基酸残基,多肽片段4为第150-197位氨基酸残基,多肽片段5为第177-217位氨基酸残基;通过PCR的方法分步扩增得到上述5个多肽片段的编码基因片段,以酶切连接法将其构建至真核表达质粒pEGFP-C3中,构建成功后转染293T细胞,24h收集细胞蛋白,经过SDS-PAGE后,进行Western blot分析(以实施例1鉴定的单克隆抗体为一抗,HRP Goat Anti-Mouse IgG为二抗)。

[0098] Western blot分析结果表明(图5),片段与泳道一一对应,泳道1、泳道2有特异性条带显示,而泳道3、泳道4、泳道5没有,则证明该抗原表位是多肽片段1与多肽片段2重叠部位(即多肽片段6,第94-115位氨基酸残基),进一步将多肽片段6分别从N端与C端缺失几个氨基酸,分成多肽片段7(第99-115位氨基酸残基)、多肽片段8(第94-108位氨基酸残基),这两个泳道均有特异性条带显示,证明抗原表位为多肽片段7和多肽片段8重叠部分(即多肽片段9,第99-108位氨基酸残基),将多肽片段9按上述方法分为多肽片段10(第101-108位氨基酸残基)、多肽片段11(第99-107位氨基酸残基),抗原表位定位在多肽片段10,将多肽片段10从N端分别缺失两个与三个氨基酸构成多肽片段12(第103-108位氨基酸残基)、多肽片段13(第104-108位氨基酸残基),最终确定该抗原表位最终定位于多肽片段12,其为M基因的第103至108位氨基酸SPESRL。

[0099] 2单克隆抗体的轻、重链可变区序列测定

[0100] 通过RNA试剂盒提取分泌抗PDCoV M蛋白杂交瘤细胞株的总RNA,进一步通过反转录试剂盒将其反转录为cDNA。

[0101] 设计轻链可变区引物序列:

[0102] VLF 5' -3' :atggagacagacacactcctgctat

[0103] VLR 5' -3' :ggatacagttggtgcagcatcagcccgttt

[0104] 设计重链可变区引物序列:

[0105] VHF 5' -3' :atggratgsagctgkgtmatsctct

[0106] VHR 5' -3' :tggggstgtygttttggctgmrgagacrgtga

[0107] PCR反应体系50μl:

- [0108] ddH₂O:39μl
- [0109] 10×PCR Buffer:5μl
- [0110] rTaq:0.25μl
- [0111] dNTP Mix:2.75μl
- [0112] 上游引物:0.5μl
- [0113] 下游引物:0.5μl
- [0114] cDNA:2μl
- [0115] PCR反应程序:98℃预变性3min;98℃变性10s、55℃退火15s、72℃延伸30s,此步骤33个循环;72℃延伸5min。
- [0116] 进一步地,将PCR产物通过试剂盒纯化后与pMD19-T载体(Takara公司)进行连接,挑取对应的阳性克隆质粒进行测序。测定单克隆抗体的重链可变区、轻链可变区氨基酸序列分别为SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3所示。其重链可变区、轻链可变区核苷酸序列分别为SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5所示。
- [0117] 实施例1制备的单克隆抗体的重链可变区的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别为SYTFSDYA、ISPYGNS和A所示;实施例1制备的单克隆抗体的轻链可变区的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别为KSVSTSGYSYL、VS和QHIREL所示。
- [0118] 试验例3单克隆抗体的特异性鉴定
- [0119] 为鉴定实施例1制备的单克隆抗体的特异性,采用该单克隆抗体对猪δ冠状病毒株PDCoV-GD16-05、猪δ冠状病毒株PDCoV-GX2018、猪δ冠状病毒株PDCoV-GDHK、猪急性腹泻综合征冠状病毒(SADS)、猪流行性腹泻冠状病毒(PEDV)、盖塔病毒(GETV)、A型塞内卡病毒(SVV)、猪萨佩罗病毒(PSV)进行Western blot分析。收集上述PDCoV的不同毒株与其它病毒株的细胞感染样品,用单克隆抗体PDCoV-M-24-A6作为一抗,HRP Goat Anti-Mouse IgG作为二抗,进行Western blot鉴定。
- [0120] Western blot鉴定结果见图6。鉴定结果表明,实施例1所制备的单克隆抗体只特异性识别PDCoV,与其它的病毒无特异性反应,表明本发明提供的单克隆抗体或其识别的抗原表位(SPEURL)具有良好的特异性,只特异性识别PDCoV,可将本发明提供的单克隆抗体或其识别的抗原表位制备成各种诊断试剂(譬如检测抗体或诊断抗原等)用于鉴别或检测猪δ冠状病毒。

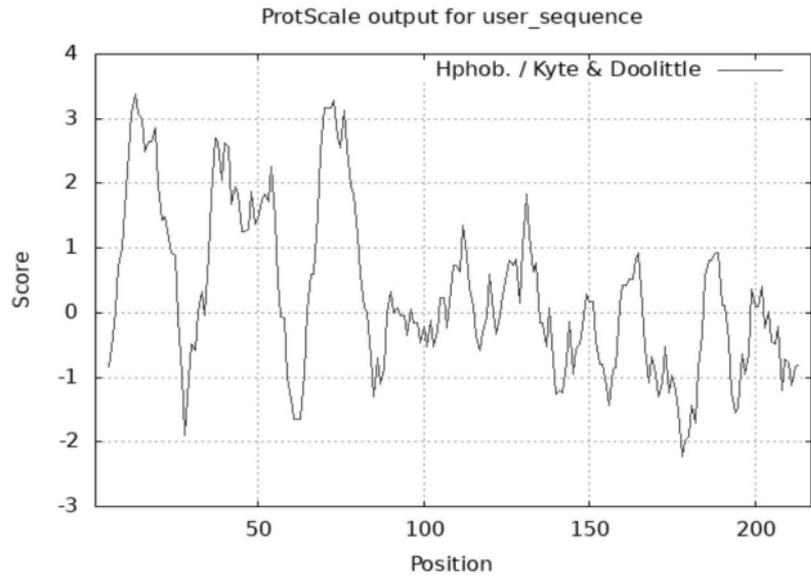


图1

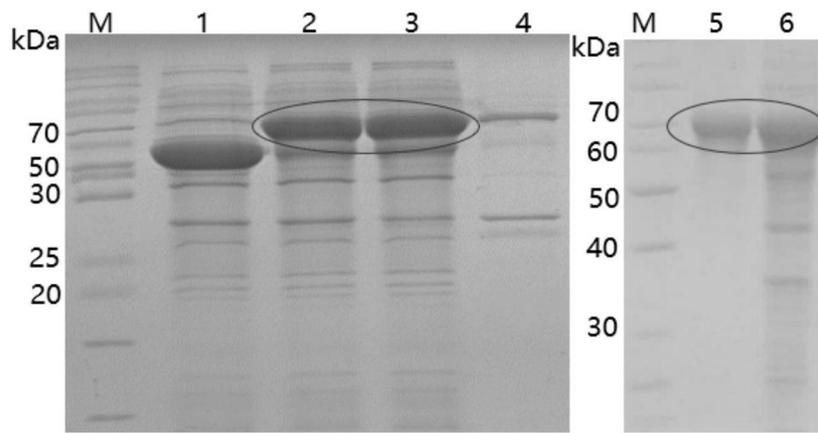


图2

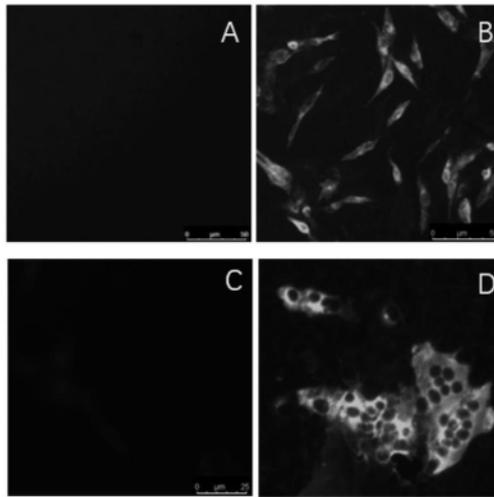


图3

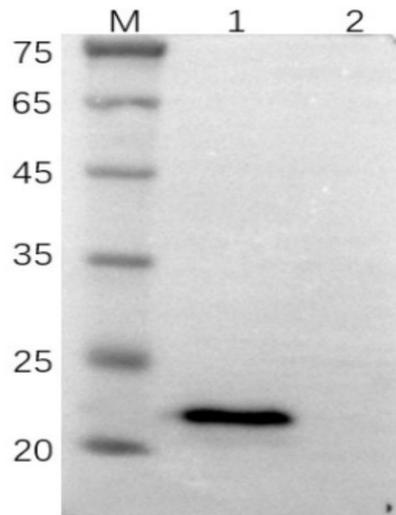


图4

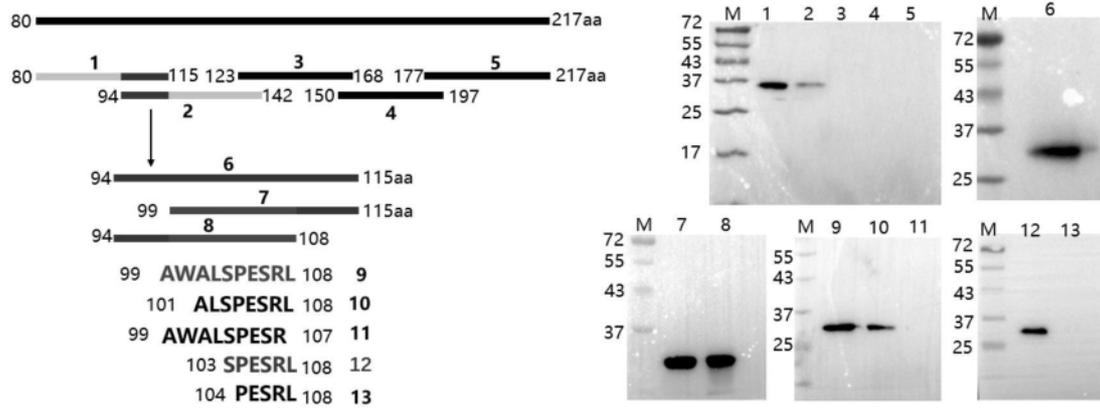


图5

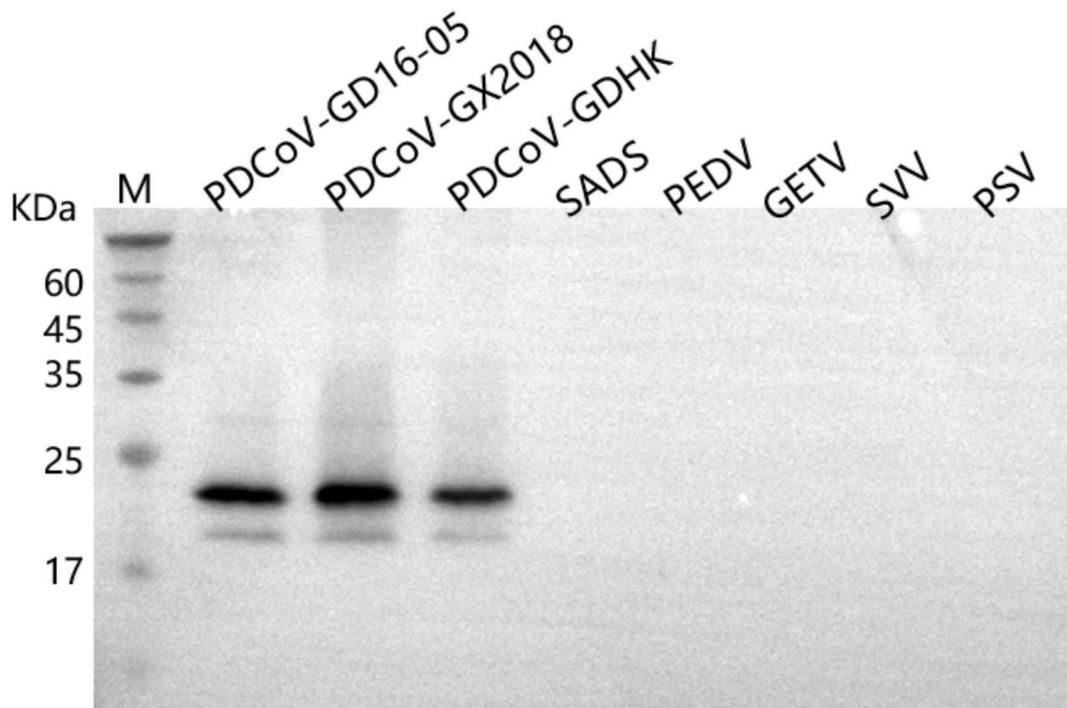


图6