



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116903709 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 07

(21) 申请号 202310817442.4

G01N 33/577 (2006.01)

(22) 申请日 2023.07.03

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 109810948 A, 2019.05.28

申请公布号 CN 116903709 A

CN 113543801 A, 2021.10.22

(43) 申请公布日 2023.10.20

CN 115073557 A, 2022.09.20

(83) 生物保藏信息

CN 115109125 A, 2022.09.27

CCTCC NO:C2023183 2023.06.29

KR 20160094674 A, 2016.08.10

(73) 专利权人 华中农业大学

吴书雅. 非洲猪瘟病毒K205R 蛋白特异性  
纳米抗体的筛选与鉴定.《河南农业大学学报》  
.2023,第57卷(第2期),第307-315页.

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山  
街1号

专利权人 武汉科维创生物科技有限公司

肖景景. 非洲猪瘟病毒无标签重组K205R抗  
原制备与应用.《扬州大学学报(农业与生命科  
学版)》.2019,第40卷(第3期),第90-94页.

(72) 发明人 赵俊龙 胡艳莉 夏颖君 张力  
方瑞 贺兰 赵鹏飞 王超飞

Shu-Jian Zhang. Comprehensive mapping  
of antigenic linear B-cell epitopes on  
K205R protein of African swine fever  
virus with monoclonal antibodies.《Virus  
Research》.2023,第328卷第1-9页. (续)

(74) 专利代理机构 武汉智嘉联合知识产权代理  
事务所(普通合伙) 42231

专利代理师 徐绍新

审查员 周奋进

(51) Int. Cl.

C07K 14/01 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

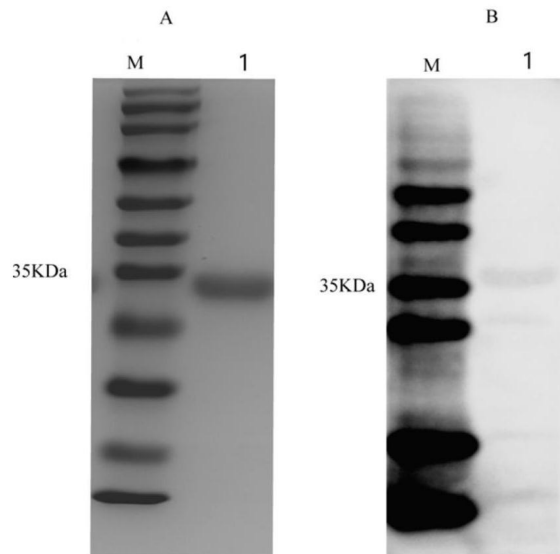
权利要求书1页 说明书8页  
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种非洲猪瘟病毒pK205R蛋白抗原表位肽  
及其单克隆抗体与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种非洲猪瘟病毒(African  
swine fever virus, ASFV) pK205R蛋白抗原表位  
肽,所述抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:  
3所示,本发明还公开了一种抗所述抗原表位肽  
的单克隆抗体及其制备方法和应用,属于分子生  
物学领域。本发明提供的抗原表位肽和单克隆抗  
体能用于非洲猪瘟病毒的检测,具有特异性好准  
确度高等优点,为研究非洲猪瘟病毒pK205R蛋白  
的生物学功能及开发检测方法提供了有价值的  
新工具。



CN 116903709 B

[接上页]

(56) 对比文件

Liwei Li. A highly efficient indirect

ELISA and monoclonal antibody established against African swine fever virus pK205R. 《Front Immunol》.2023,第13卷第1-14页.

1. 一种非洲猪瘟病毒 (*African swine fever virus*, ASFV) 抗原表位肽, 其特征在于: 所述抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。
2. 一种融合蛋白, 其特征在于: 在权利要求1所述的抗原表位肽的N端添加1个半胱氨酸, 并将所述半胱氨酸与载体蛋白偶联后得到所述融合蛋白。
3. 如权利要求2所述的融合蛋白, 其特征在于: 所述载体蛋白为牛血清白蛋白。
4. 一种单克隆抗体, 其特征在于: 所述单克隆抗体的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示、轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。
5. 一种制备权利要求4所述单克隆抗体的方法, 其特征在于: 使用杂交瘤细胞株分泌所述单克隆抗体, 所述杂交瘤细胞株保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为CCTCC NO: C2023183。
6. 权利要求1所述的抗原表位肽或权利要求2或3所述的融合蛋白或权利要求4所述的单克隆抗体在制备非洲猪瘟病毒诊断试剂盒中的用途。
7. 一种非洲猪瘟病毒诊断试剂盒, 该试剂盒中含有权利要求1所述的抗原表位肽或权利要求2或3所述的融合蛋白或权利要求4所述的单克隆抗体。
8. 一种非诊断目的检测非洲猪瘟病毒的方法, 其特征在于: 利用权利要求1所述的抗原表位肽或权利要求2或3所述的融合蛋白或权利要求4所述的单克隆抗体对非洲猪瘟病毒进行ELISA检测。

## 一种非洲猪瘟病毒pK205R蛋白抗原表位肽及其单克隆抗体与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学领域,具体涉及一种非洲猪瘟病毒pK205R蛋白抗原表位肽及其单克隆抗体、制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 非洲猪瘟(*African swine fever*, ASF)是猪的一种由非洲猪瘟病毒(*African swine fever virus*, ASFV)引起的具有高度传染性、高发病率、高死亡率的病毒性疾病。

[0003] ASFV是一种复杂的包膜病毒,直径约为200nm,病毒粒子呈二十面体对称,基因组是由单个线性、共价封端的双链DNA组成,基因组长度在170~190Kbp之间:一般情况下不同毒株的基因组长度可能会存在差异,然而基因组长度的差异主要是由在左右可变区的多基因家族成员组成的不同引起的。ASFV基因组包含151~167个开放阅读框(ORFs),可编码150~200种蛋白质。由于该病毒颗粒的复杂性以及ASFV能够干扰导致免疫调节的各种细胞信号传导途径等,导致目前还没有发现有效的治疗药物及疫苗,所以对于ASFV的检测及防控至关重要。

[0004] 目前对ASFV蛋白的研究主要集中在p54、p30、p72、CD2V等。pK205R蛋白由K205R基因编码,该蛋白在ASFV宿主感染4h之后就出现了,在感染过程中持续存在,是早期表达的功能蛋白,故pK205R可作为早期检测指标。目前对于pK205R的抗原表位及功能研究较少,本发明通过制备一株鼠源pK205R单克隆抗体,并对pK205R抗原表位进一步筛选鉴定,对深入研究pK205R功能及开发检测方法具有重要意义。

### 发明内容

[0005] 本发明目的主要是提供一种非洲猪瘟病毒pK205R蛋白抗原表位肽,其单克隆抗体及制备方法,以及所述抗原表位肽和单克隆抗体在非洲猪瘟病毒诊断和检测中应用,为进一步研究pK205R蛋白的生物学功能及开发诊断试剂提供有价值的工具。

[0006] 为实现上述目的,申请人利用非洲猪瘟病毒pK205R蛋白作为免疫原,利用其免疫小鼠并获得一株杂交瘤细胞株2C4,鉴定了单克隆抗体2C4与pK205R蛋白的反应原性。接着,通过截短表达pK205R蛋白,找到了一段能与单克隆抗体2C4特异性反应的氨基酸序列。进一步地,申请人合成了氨基酸序列并将其与载体蛋白偶联,验证了融合蛋白的反应原性,发现其与单克隆抗体2C4、ASFV阳性血清、pK205R蛋白免疫血清均能发生反应。因此,该氨基酸序列可作为pK205R蛋白的抗原表位用于非洲猪瘟病毒的诊断与鉴定。

[0007] 具体的技术方案如下:

[0008] 本发明首先提供了一种非洲猪瘟病毒pK205R蛋白抗原表位肽,所述抗原表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,共19个氨基酸。

[0009] 所述抗原表位肽来源于非洲猪瘟病毒,具体而言,它是非洲猪瘟病毒pK205R蛋白中的一部分片段,因此能与非洲猪瘟病毒抗体以及pK205R蛋白抗体发生反应,可用于相关

抗体的检测进而实现非洲猪瘟病毒的诊断与鉴定。与现有的检测靶标相比,本发明提供的抗原表位肽仅19个氨基酸,具有合成工艺简单,检测特异性高等优点。

[0010] 本发明进一步提供了一种融合蛋白,所述融合蛋白由以上所述的抗原表位肽和N端的1个半胱氨酸残基组成,且所述半胱氨酸与载体蛋白偶联。通过将抗原表位肽与载体蛋白偶联以提高肽段的反应原性。

[0011] 所述载体蛋白包括但不限于牛血清白蛋白。

[0012] 本发明还提供了一种单克隆抗体,所述单克隆抗体能特异性结合以上所述的抗原表位肽或所述的融合蛋白或非洲猪瘟病毒pK205R蛋白或非洲猪瘟病毒,并且所述单克隆抗体是利用非洲猪瘟病毒pK205R蛋白免疫小鼠后生成的。

[0013] 其中,所述单克隆抗体的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示、轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0014] 进一步地,本发明还提供了一种所述单克隆抗体的制备方法,利用非洲猪瘟病毒pK205R蛋白免疫小鼠,将小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合和亚克隆筛选得到杂交瘤细胞株,最后采用体内诱生腹水法制备获得单克隆抗体。

[0015] 其中,所述杂交瘤细胞株为2C4株,该细胞株已于2023年6月29日保藏于湖北省武汉市武汉大学的中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:C2023183。

[0016] 最后,本发明还提供了所述的抗原表位肽、融合蛋白、单克隆抗体在制备非洲猪瘟病毒诊断试剂盒中的用途,以及一种非洲猪瘟病毒诊断试剂盒和非洲猪瘟病毒的检测方法。

[0017] 在获得检测抗原或抗体的前提下,对试剂盒进行组装并将其用于相应抗体或抗原的检测对本领域技术人员而言不存在技术障碍。

[0018] 本发明的一个具体实施例提供了利用所述单克隆抗体对pK205R蛋白进行ELISA检测和免疫印迹检测(Western blotting)的具体实施方案,本发明的另一个具体实施例还提供了利用所述单克隆抗体对所述抗原表位肽进行免疫印迹检测的具体实施方案。

[0019] 本发明的一个具体实施例还提供了一种利用所述抗原表位肽对单克隆抗体2C4、ASFV阳性血清、pK205R蛋白免疫血清进行ELISA检测的具体实施方案。

[0020] 本发明的保护范围不局限于说明书所公开的内容,在本领域技术人员获得本发明所提供的抗原表位肽、融合蛋白、单克隆抗体的前提下,可根据免疫学原理使用各种不同的方法对非洲猪瘟病毒进行检测,这些在本发明基础上所做出的各种变形或替代方案均包含在本发明的保护范围之内。

[0021] 本发明的有益效果是:

[0022] 本发明公开的单克隆抗体,是利用原核表达系统表达pK205R蛋白,再将纯化的pK205R蛋白作为免疫原免疫BALB/c小鼠,通过细胞融合技术筛选获得阳性杂交瘤细胞,最终经过体内诱生腹水法制备得到。该单克隆抗体能够特异性的识别结合pK205R蛋白的抗原表位为<sup>81</sup>GAIIAQLEILMINGTPLPA<sup>99</sup>,且该抗原表位可以与非洲猪瘟病毒猪血清发生特异性反应,这为进一步研究pK205R蛋白的生物学功能及开发检测方法提供了非常有价值的新工具。

## 附图说明

[0023] 图1:表达与纯化后的非洲猪瘟病毒pK205R蛋白的检测结果。A为纯化pK205R蛋白的电泳分析结果,B为纯化pK205R蛋白的Western blotting鉴定结果,其中M为Marker,1为纯化后的pK205R蛋白。

[0024] 图2:细胞染色体分析结果。A为杂交瘤细胞株2C4染色体,B为SP2/0染色体。

[0025] 图3:腹水纯化电泳分析结果。

[0026] 图4:Western blotting鉴定单克隆抗体与pK205R蛋白及无关蛋白p30、p72的反应性。

[0027] 图5:Western blotting鉴定截短表达pK205R蛋白与单克隆抗体反应性,其中M为Marker,1为截短pK205R蛋白K-1(1-100aa),2为截短pK205R蛋白K-2(52-154aa),3为截短pK205R蛋白K-3(101-205aa)。

[0028] 图6:Western blotting鉴定截短表达pK205R蛋白与单克隆抗体反应性,其中M为Marker,4为截短pK205R蛋白K-4(1-80aa),5为截短pK205R蛋白K-5(1-90aa),6为截短pK205R蛋白K-6(94-205aa),7为截短pK205R蛋白K-7(95-205aa),8为截短pK205R蛋白K-8(97-205aa),9为截短pK205R蛋白K-9(98-205aa)。

[0029] 图7:Western blotting鉴定截短表达pK205R蛋白与单克隆抗体反应性,其中M为Marker,10为截短pK205R蛋白K-10(1-81aa),11为截短pK205R蛋白K-11(99-205aa),12为截短pK205R蛋白K-12(100-205aa)。

## 具体实施方式

[0030] 以下通过具体实施例对本发明进行详细说明。

[0031] 实施例1非洲猪瘟病毒pK205R蛋白原核表达与纯化

[0032] 选取GenBank中African swine fever virus isolate Pig/HLJ/2018(GenBank:MK333180.1)的K205R基因全长序列,由生物公司合成,然后将合成的K205R基因片段克隆到原核表达载体pET-30a(+)的E<sub>Coli</sub>、XhoI酶切位点之间,利用异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达蛋白,诱导条件为28℃过夜诱导,IPTG浓度为1mmol/L,用Ni-亲和层析法纯化蛋白,用SDS-PAGE(图1A)和Western blotting(图1B)分析蛋白表达纯化情况,根据结果分析得到了纯度较高的pK205R蛋白(图1)。

[0033] 实施例2抗非洲猪瘟病毒pK205R蛋白单克隆抗体的制备

[0034] 1. 动物免疫

[0035] 用抗原pK205R蛋白免疫5只6周龄的雌性BALB/c小鼠,小鼠编号1-5,抗原100μg/只,与等体积弗氏完全佐剂乳化成稠厚的乳剂用于首次免疫,小鼠多点皮下注射。间隔两周,用弗氏不完全佐剂与pK205R蛋白乳化后以相同的方法和剂量对BALB/c小鼠进行加强免疫,一共加强免疫两次。第二次加强免疫后一周用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定通过尾尖采血收集的BALB/c小鼠血清抗体效价。免疫血清效价均大于 $1:6.4 \times 10^4$ ,其中3号免疫小鼠抗体效价最高,达到 $1:2.56 \times 10^5$ ,选择这只BALB/c小鼠进行细胞融合。于细胞融合前3天用pK205R蛋白对BALB/c小鼠进行腹腔注射冲击免疫,免疫剂量50μg/只。

[0036] 2. 细胞融合

[0037] 在进行细胞融合前一个星期复苏SP2/0细胞,连续传代培养,使其状态良好。取一

只8周龄未免疫的BALB/c小鼠,收集腹腔巨噬细胞和脾细胞混合作为饲养层细胞,使96孔板每孔 $10^5$ 个饲养层细胞,融合前一天将饲养层细胞铺进96孔板中。取免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0以约8:1比例,用PEG 1500进行融合,融合后第2天观察是否污染,第4天补加一滴HAT培养基,第8-10天每孔吸去100 $\mu$ L培养基更换为100 $\mu$ LHT培养基,待细胞长至视野1/4-1/2时,用间接ELISA进行抗体检测筛选阳性杂交瘤细胞。

### [0038] 3. 阳性杂交瘤细胞的筛选

[0039] 用间接ELISA方法检测细胞培养上清液,筛选出阳性杂交瘤细胞。pK205R蛋白用包被液稀释到最佳浓度2 $\mu$ g/mL,每孔加入100 $\mu$ L包被酶标板,4 $^{\circ}$ C过夜;次日取出用洗涤液PBST洗3次后拍干,每孔加入150 $\mu$ L封闭液(1%BSA),于37 $^{\circ}$ C孵育1h,PBST洗涤3次;加入杂交瘤的培养上清100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h,PBST洗3次;加入羊抗鼠IgG-HRP(1:5000稀释),37 $^{\circ}$ C孵育1h,PBST洗涤3次;每孔加入100 $\mu$ L TMB底物显色液,避光显色10min,每孔加入50 $\mu$ L 0.25% HF终止反应,在630nm的波长下测OD值。同时设阴阳性对照(免疫小鼠阳性血清为阳性对照,设置SP2/0细胞的培养上清、健康小鼠血清作为阴性对照),P/N值大于2.1判为阳性。根据间接ELISA检测结果选取生长旺盛形态好的阳性杂交瘤细胞进行亚克隆,同时进行扩大培养,及时冻存。

### [0040] 4. 杂交瘤细胞克隆化

[0041] 用有限稀释法进行亚克隆,克隆当天制备饲养层细胞。将杂交瘤细胞用HT完全培养基稀释到每孔0.8个细胞加入已制备好饲养层细胞的96孔培养板,100 $\mu$ L/孔。培养至第7天仔细观察并记录各孔内细胞的生长情况,细胞克隆长满培养孔1/3-1/2时,用间接ELISA方法进行抗体检测,选择抗体效价高、呈单克隆生长、形态良好的细胞孔,继续同法再克隆,直至所有孔都为阳性,亚克隆3次之后获得稳定分泌抗非洲猪瘟病毒pK205R蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株,即获得目的杂交瘤细胞,将其命名为杂交瘤细胞株2C4,将其扩大培养,细胞数按 $1 \sim 2 \times 10^6$ /管进行冻存。

### [0042] 5. 杂交瘤细胞株的鉴定

#### [0043] (1) 染色体分析

[0044] 对杂交瘤细胞进行染色体分析可获得其是否是真正的杂交瘤细胞的客观指标之一,杂交瘤细胞的染色体数目接近两种亲本细胞染色体数目的总和,正常小鼠脾细胞的染色体数目为40条,SP2/0为62-68条。另一方面,杂交瘤细胞的染色体分析对了解杂交瘤细胞分泌抗体的能力有一定的意义,一般来说,杂交瘤细胞染色体数目较多且较集中,其分泌抗体能力则高,反之,其分泌抗体能力则低。

[0045] 检查杂交瘤细胞染色体的方法最常用秋水仙素法,其原理是应用秋水仙素特异的破坏纺锤丝而获得中期分裂相细胞;再用0.075mol/L KCl溶液低渗处理,使细胞膨胀,体积增大,染色体松散;经甲醇-冰醋酸溶液固定,即可观察检查。具体步骤:用24孔板培养的杂交瘤细胞(约在加秋水仙素前36-48小时将杂交瘤细胞传代),待生长至对数时期加入秋水仙素,使最终浓度为0.4 $\mu$ g/ml,37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub>培养3-6h,SP2/0以相同方式处理作为对照;然后倾出秋水仙素处理液,加入RPMI-1640基础培养基将细胞吹起,1000rpm/min离心10min收集细胞沉淀,将细胞沉淀用1ml 37 $^{\circ}$ C预热的0.075mol/L的KCl低渗溶液重悬,混匀后,于37 $^{\circ}$ C静置30min;再加入1ml新配制的固定液(甲醇:冰乙酸=3:1),混匀,1000rpm/min离心10min,弃上清;然后再重复固定两次,最后用50 $\mu$ l固定液重悬细胞;吸取细胞悬液,滴在于4

℃预冷的干净载玻片上,室温下自然干燥;用10% Giemsa染色10-20min,流水冲洗,自然干燥;选择染色体分散好,无重叠,无失散的细胞进行观察分析。分泌抗非洲猪瘟病毒pK205R蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞染色体数目约为100条(图2A),SP2/0约为57条(图2B)。

#### [0046] (2) 杂交瘤细胞稳定性分析

[0047] 阳性杂交瘤细胞在相同条件下连续传代培养20代,应用间接ELISA测定阳性杂交瘤细胞分泌抗体效价,设置SP2/0细胞上清液为阴性对照,分析其分泌抗体的稳定性。结果显示杂交瘤细胞连续传代培养20代,其分泌抗体效价均大于1:6400,稳定性良好。

#### [0048] (3) 抗体亚型鉴定

[0049] 从北京博奥龙生物技术有限公司购买亚型鉴定所需酶标二抗,利用间接ELISA法鉴定杂交瘤细胞培养上清中单克隆抗体的亚型,结果表明抗体重链为IgG2a,轻链为Kappa链。

#### [0050] 6. 杂交瘤细胞测序

[0051] 将得到的杂交瘤细胞株2C4由南京德泰生物工程有限公司进行测序,得到了重链、轻链可变区的氨基酸序列,其结果如下:

[0052] 重链可变区氨基酸序列为:QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKSSGYTFTSYWMHWVKRPGQGL  
EWIGEINPSNGRTKYNEKFKTKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARAFITMDYWGQGTSTVTVSS

[0053] 轻链可变区氨基酸序列为:DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSINKYLAWYQEKPQKTNK  
LLIQSGSSLQSGIPSRFSGSGSGTDFALTISSLEPEDFAMYYCQQNLEYPWTFGGGTKLEIK

#### [0054] 7. 腹水制备

[0055] 每只BALB/c小鼠腹腔注射0.5mL弗氏不完全佐剂,7天后,每只BALB/c小鼠腹腔注射 $1 \times 10^6$ 个杂交瘤细胞,注射细胞7d后,观察到小鼠腹腔明显膨大,用注射器收取腹水,每间隔1-2d抽取一次,连续抽3次,每次抽取腹水之后,4℃,3000rpm/min,离心10min,去除脂肪组织,吸取上清,-20℃保存备用。将收集的腹水用Protein G亲和纯化方法纯化腹水,得到纯度较高的抗体(图3),将其命名为单克隆抗体2C4。

#### [0056] 8. 单克隆抗体特性鉴定

##### [0057] (1) 单克隆抗体效价测定

[0058] 利用间接ELISA方法测定抗体效价,包被抗原为原核表达的非非洲猪瘟病毒pK205R蛋白,将纯化的单克隆抗体2C4从1:400开始进行2倍倍比稀释,依次加入酶标板中,间接ELISA检测结果显示单克隆抗体2C4抗体效价为 $1:5.12 \times 10^4$ 。

##### [0059] 表1单克隆抗体效价测定结果

[0060]

稀释倍数	腹水	P/N值	2C4	P/N值
1:400	1.193	20.220	1.200	20.339
1:800	1.199	21.411	1.166	20.821
1:1600	1.206	23.192	1.132	21.769
1:3200	1.202	21.855	1.006	18.291
1:6400	1.199	23.510	0.825	16.176
1:12800	1.219	21.768	0.590	10.536
1:25600	1.136	21.846	0.320	6.154
1:51200	1.001	18.537	0.119	2.204



1:102400	0.835	17.041	0.090	1.837
1:204800	0.609	12.957	0.066	1.404

[0061] (2)Western blotting检测pK205R蛋白与单克隆抗体的反应原性

[0062] pK205R重组蛋白及ASFV p30、p72重组蛋白(设为阴性对照)经过处理后,进行SDS-PAGE,然后将其转移到PVDF膜上,室温封闭2h,然后将单克隆抗体2C4按照1:5000稀释,4℃孵育过夜,HRP-羊抗鼠IgG 1:5000稀释,室温孵育1h。结果显示单克隆抗体2C4只识别蛋白分子量约为35kDa大小的pK205R重组蛋白,产生清晰的特异性条带,不与其他无关蛋白反应(图4),特异性良好。

[0063] 实施例3单克隆抗体识别抗原表位的鉴定

[0064] 首先采用部分重叠截短表达pK205R蛋白,将pK205R蛋白截短分成3段(1-100aa、52-154aa、101-205aa),分别命名为K-1、K-2、K-3,根据表2中的引物扩增各个目的片段,使用同源重组的方法将目的片段连接到pET-30a(+)表达载体上,截短表达的蛋白均为可溶性蛋白,用Ni-亲和层析法纯化蛋白,然后用Western blotting鉴定His标签鼠源单克隆抗体、单克隆抗体2C4与K-1、K-2、K-3蛋白反应性,根据鉴定结果His标签鼠源单克隆抗体与K-1、K-2、K-3蛋白均反应,表明三个蛋白均成功正确表达,单克隆抗体2C4只与K-1、K-2特异性反应(图5),初步鉴定单克隆抗体2C4识别pK205R蛋白抗原表位在1-100aa之间。

[0065] 根据上述结果,进一步将pK205R蛋白1-80aa、1-90aa、94-205aa、95-205aa、97-205aa、98-205aa截短表达,分别命名为K-4、K-5、K-6、K-7、K-8、K-9,同样使用同源重组的方法将目的片段连接到pET-30a(+)表达载体上,截短表达的蛋白均为可溶性蛋白,用Ni-亲和层析法纯化蛋白,同样用Western blotting鉴定His标签鼠源单克隆抗体、单克隆抗体2C4与得到的蛋白K-4、K-5、K-6、K-7、K-8、K-9的反应性,结果His标签鼠源单克隆抗体与K-4、K-5、K-6、K-7、K-8、K-9均反应,说明K-4、K-5、K-6、K-7、K-8、K-9蛋白均成功表达,单克隆抗体2C4与K-5、K-6、K-7、K-8、K-9蛋白均发生反应,不与K-4蛋白反应(图6),结合初步鉴定的结果,进一步鉴定单克隆抗体2C4识别pK205R蛋白抗原表位在81-100aa之间。

[0066] 最后精确定位单克隆抗体识别的抗原表位,将pK205R蛋白1-81aa、99-205aa、100-205aa分别截短表达,分别命名为K-10、K-11、K-12,方法同上构建原核表达质粒,表达纯化出可溶性蛋白,然后用Western blotting鉴定His标签鼠源单克隆抗体、单克隆抗体2C4与截短表达蛋白的反应性,结果His标签鼠源单克隆抗体与K-10、K-11、K-12蛋白均反应,表明均成功正确表达,单克隆抗体2C4与K-10、K-11蛋白发生特异性反应,不与K-12蛋白反应(图7),表明抗非洲猪瘟病毒pK205R蛋白单克隆抗体2C4识别抗原表位在81-99aa之间,其氨基酸序列为<sup>81</sup>GAIIAQLEILMINGTPLPA<sup>99</sup>。

[0067] 表2pK205R蛋白截短表达引物序列

截短片段	序列 (5' -3')	氨基酸起止
K-1	F:CATGGCTGATATCGGATCCGAATTCATGGTTGAGCCACGCGAA	1-100aa
	R:AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTATTTGCCGGAAGTGGAGT	
K2	F:CATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAAAAAATATTCAAGACCTTCAG	52-154aa
	R:AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTATCGAAAAGTATTTCGAGGATGC	
K-3	F:CATGGCTGATATCGGATCCGAATTCAGACAACAATTAAGGAGGCT	101-205aa
	R:AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTACTTCTTCATCATCTCTTT	
K-4	F:CATGGCTGATATCGGATCCGAATTCATGGTTGAGCCACGCGAA	1-80aa
	R:AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTAAAGCTGAATTTTGTATC	
K-5	F:CATGGCTGATATCGGATCCGAATTCATGGTTGAGCCACGCGAA	1-90aa
	R:AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTATAGAATCTCAAGTTGGGC	
K-6	F:CATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGGCACTCCACTTCCGGCA	94-205aa
	R:AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTACTTCTTCATCATCTCTTT	
K-7	F:CATGGCTGATATCGGATCCGAATTCACTCCACTTCCGGCAAAA	95-205aa
	R:AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTACTTCTTCATCATCTCTTT	
K-8	F:CATGGCTGATATCGGATCCGAATTCCTTCCGGCAAAAAAGACA	97-205aa
	R:AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTACTTCTTCATCATCTCTTT	
K-9	F:CATGGCTGATATCGGATCCGAATTCCTTCCGGCAAAAAAGACAACA	98-205aa
	R:AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTACTTCTTCATCATCTCTTT	
K-10	F:CATGGCTGATATCGGATCCGAATTCATGGTTGAGCCACGCGAA	1-81aa
	R:AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTATCCAAGCTGAATTTTGTATC	
K-11	F:CATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGCAAAAAAGACAACAATTAAG	99-205aa
	R:AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTATTTGCCGGAAGTGGAGT	
K-12	F:CATGGCTGATATCGGATCCGAATTCAAAAAGACAACAATTAAGGAG	100-205aa
	R:AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTATTTGCCGGAAGTGGAGT	

[0068]

[0069] 实施例4合成抗原表位肽并鉴定其功能

[0070] 根据实施例3中鉴定的单克隆抗体2C4识别抗原表位氨基酸序列<sup>81</sup>GAIIAQLEILMINGTPLPA<sup>99</sup>, 在其N端加一个半胱氨酸, 即该多肽序列为CGAIIAQLEILMINGTPLPA, 将该多肽序列交由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 并将该多肽N端偶联到BSA上。将BSA偶联多肽用灭菌蒸馏水溶解, 使其浓度为1mg/mL。

[0071] 应用间接ELISA方法鉴定BSA偶联多肽与单克隆抗体2C4、ASFV阳性血清、ASFV阴性血清、pK205R蛋白免疫BALB/c小鼠血清和健康BALB/c小鼠血清的反应性。间接ELISA方法检测程序同实施例2中筛选阳性杂交瘤细胞的间接ELISA方法, 其中偶联多肽包被浓度为5μg/mL, 当检测单克隆抗体2C4时, 按照1:500稀释, 检测猪血清及BALB/c小鼠血清时, 按照1:200

稀释,37℃孵育30min,羊抗鼠IgG-HRP按照1:5000稀释,羊抗猪IgG-HRP按照1:6000稀释,37℃孵育30min。

[0072] 根据检测结果(表3),合成的非洲猪瘟病毒pK205R蛋白B细胞抗原表位多肽偶联BSA后能够与单克隆抗体2C4、ASFV阳性血清、pK205R蛋白免疫BALB/c小鼠血清能发生良好反应,说明该多肽为pK205R蛋白抗原表位,因此可以进一步将该抗原表位应用于非洲猪瘟病毒抗体检测。

[0073] 表3BSA偶联多肽的间接ELISA检测结果

检测样品	OD <sub>630nm</sub>			
	第一次检测	第二次检测	第三次检测	平均值
单克隆抗体 2C4	0.581	0.566	0.578	0.575
[0074] pK205R 蛋白免疫 BALB/c 小鼠血清	1.073	1.016	1.019	1.036
健康 BALB/c 小鼠血清	0.094	0.087	0.094	0.092
ASFV 阳性血清	0.798	0.801	0.805	0.801
ASFV 阴性血清	0.098	0.102	0.105	0.102

[0075] 综上所述,本发明提供了一株针对ASFV pK205R蛋白的单克隆抗体及其抗原表位肽,本发明得到的单克隆抗体能特异性识别pK205R蛋白,抗体效价高,且利用单克隆抗体鉴定出的pK205R抗原表位肽与ASFV阳性血清发生良好反应,可将其进一步应用于对pK205R蛋白的功能研究及检测方法的开发。

[0076] 以上实施例仅是对本发明技术方案的部分描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对上述实施例做出的各种变形和改进,均应落入权利要求书确定的保护范围内。

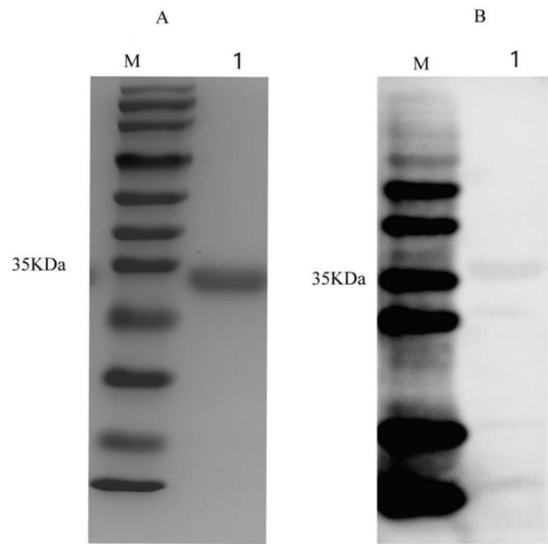


图1

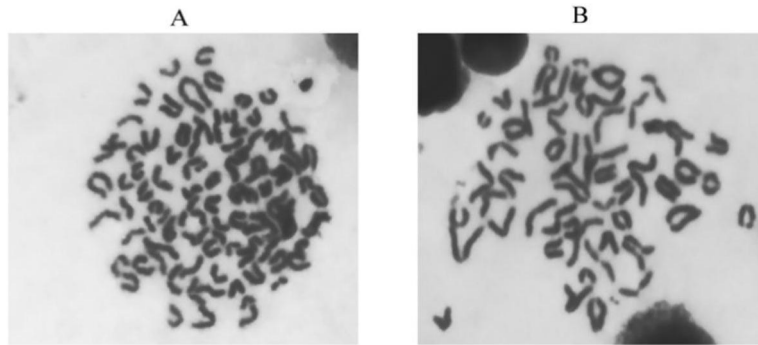


图2

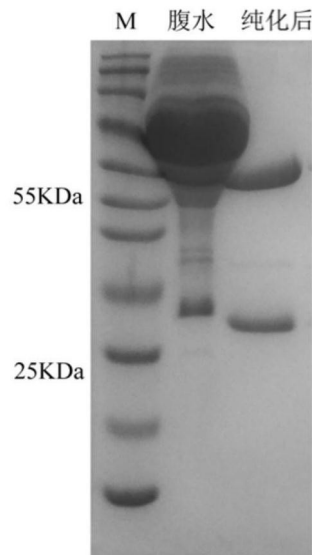


图3

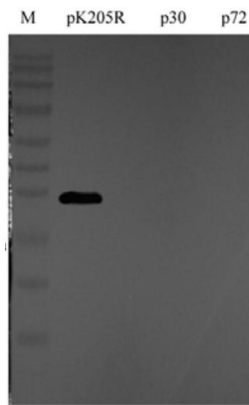


图4

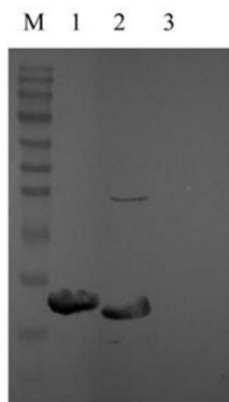


图5

M 4 5 6 7 8 9

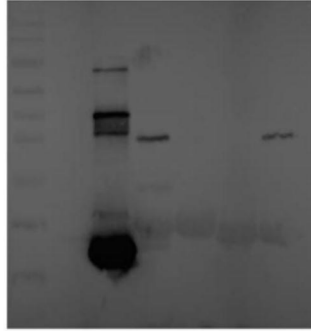


图6

M 10 11 12

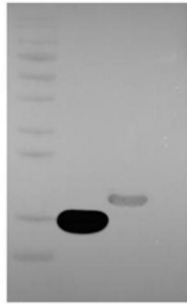


图7