



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118185881 A

(43) 申请公布日 2024.06.14

(21) 申请号 202410461875.5

G01N 33/577 (2006.01)

(22) 申请日 2024.04.17

G01N 33/569 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

A61K 39/42 (2006.01)

CCTCC NO: C202440 2024.03.13

A61P 31/20 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

(71) 申请人 中国动物卫生与流行病学中心

地址 266033 山东省青岛市市北区南京路
369号

(72) 发明人 包静月 张永强 王淑娟 王志亮

(74) 专利代理机构 北京识然知识产权代理事务
所(普通合伙) 11975

专利代理师 曾庆国

(51) Int. Cl.

C12N 5/20 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

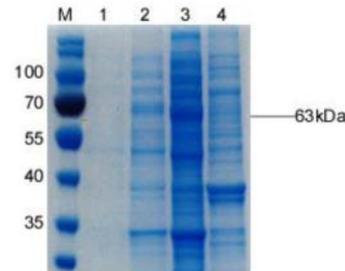
权利要求书1页 说明书6页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种非洲猪瘟的单克隆抗体及抗原表位

(57) 摘要

本发明的目的是提供一种非洲猪瘟的单克隆抗体及抗原表位,即在使用CP312R蛋白作为抗原来制备单克隆抗体,并发现了对应的抗原表位,从而为ASFV的CP312R蛋白结构和功能的研究及血清学诊断试剂的研发奠定基础。本发明所提供的杂交瘤细胞,其保藏编号为CCTCC NO: C202440。所制备的单克隆抗体,其重链的氨基酸序列为SEQ ID NO:1,其轻链的氨基酸序列为SEQ ID NO:3。本发明还提供一种抗原表位肽,其序列SEQ ID NO:5。



1. 一种杂交瘤细胞,其特征在于,所述的杂交瘤细胞是使用非洲猪瘟病毒的CP312R蛋白作为抗原来免疫小鼠后制备的。
2. 如权利要求1所述的杂交瘤细胞,其特征在于,所述的杂交瘤细胞的保藏编号为CCTCC NO:C202440。
3. 一种单克隆抗体,其特征在于,所述的单克隆抗体是由权利要求2所述的杂交瘤细胞制备的。
4. 如权利要求3所述的单克隆抗体,其特征在于,所述的单克隆抗体的重链的氨基酸序列为SEQ ID NO:1,其轻链的氨基酸序列为SEQ ID NO:3。
5. 如权利要求4所述的单克隆抗体,其特征在于,所述的单克隆抗体的重链,其编码核苷酸片段的序列为SEQ ID NO:2。
6. 如权利要求4所述的单克隆抗体,其特征在于,所述的单克隆抗体的轻链,其编码核苷酸片段的序列为SEQ ID NO:4。
7. 权利要求3所述的单克隆抗体在制备检测猪瘟病毒的制品,或制备预防治疗猪瘟病毒的制品中的应用。
8. 一种检测猪瘟病毒的制品,或制备预防治疗猪瘟病毒的制品,其特征在于,所述的制品中包含有权利要求1所述的杂交瘤细胞或权利要求3所述的单克隆抗体。
9. 一种抗原表位肽,其特征在于,所述的抗原表位肽用于结合权利要求3所述的单克隆抗体。
10. 如权利要求9所述的抗原表位肽,其特征在于,所述的抗原表位肽的序列为SEQ ID NO:5。

一种非洲猪瘟的单克隆抗体及抗原表位

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程药物和疫苗制造技术领域,具体涉及一种非洲猪瘟的单克隆抗体及抗原表位。

背景技术

[0002] 非洲猪瘟是一种高致命性的传染病,于1921年在肯尼亚首次被报道,并蔓延至整个撒哈拉以南非洲。2007年,格鲁吉亚出现了一种高致命性基因2型ASFV (Georgia07),随后在东欧国家快速传播。2018年,Georgia-07样基因2型 ASFV 在中国出现,并传播到其他15个亚洲国家,导致欧亚国家损失700多万头猪,给养猪业造成重大损失。非洲猪瘟病毒作为非洲猪瘟病毒科唯一成员,分子结构复杂,能够编码多种蛋白质,其结构和免疫逃避机制复杂。目前,由于其遗传复杂性、许多基因仍未得到充分研究以及流行毒株的多样性,缺乏有效治疗方法和疫苗。只能通过动物检疫、扑杀和消灭受影响的猪只以及严格的生物安全等措施来控制。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种非洲猪瘟的单克隆抗体及抗原表位,即在使用CP312R蛋白作为抗原来制备单克隆抗体,并发现了对应的抗原表位,从而为ASFV的CP312R蛋白结构和功能的研究及血清学诊断试剂的研发奠定基础。

[0004] 本发明首先提供一种杂交瘤细胞,所述的杂交瘤细胞是使用非洲猪瘟病毒的CP312R蛋白作为抗原来免疫小鼠后制备的;

作为实施例的具体记载,所述的杂交瘤细胞系(Hybridoma cell line)为WLB-CP312R-7C11,于2024年3月13日保藏在武汉、武汉大学的中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO: C202440。

[0005] 本发明还保护一种单克隆抗体,所述的单克隆抗体是由上述杂交瘤细胞制备的;更进一步的,所述的单克隆抗体,其重链的氨基酸序列为SEQ ID NO:1,其轻链的氨基酸序列为SEQ ID NO:3;

其中编码重链的核苷酸片段的序列为SEQ ID NO:2,编码轻链的核苷酸片段的序列为SEQ ID NO:4。

[0006] 本发明的单克隆抗体可用于制备检测猪瘟病毒的制品,或预防治疗猪瘟病毒的制品。

[0007] 本发明还提供一种抗原表位肽,所述的抗原表位肽的序列为GLTVKKNEQG (SEQ ID NO:5)。

[0008] 本发明利用大肠杆菌表达系统获得可溶性重组CP312R蛋白,将其作为抗原免疫BALB/c小鼠,制备了针对CP312R蛋白的单克隆抗体。所制备的单克隆抗体具有良好的特异性,并对其抗原表位进行鉴定。

附图说明

[0009] 图1: CPC312R表达和纯化产物的电泳检测图;

图2:用蛋白质印迹法检测靶蛋白的电泳图,其中以ASFV阳性猪血清为一抗,评估靶蛋白的免疫原性;图中M为蛋白质标记,泳道1为纯化后的CP312R蛋白;

图3:重组CP312R蛋白免疫后ELISA检测小鼠抗体效价图,其中1~4代表1、2、3和4号免疫鼠;

[0010] 图4:单克隆抗体抗体亚型分析结果图,其中SP2/0细胞上清液用作阴性对照;

图5:免疫印迹法对单克隆抗体的反应特性分析图,其中M为蛋白质标记;另一泳道为纯化的CP312R蛋白;

图6:IFA法测定单克隆抗体mAb 7C11与ASFV的反应特性图;

图7:mAb 7C11表位的精确定位图,是将CP312R的一系列截短片段克隆到pGEX-6p-1中,并以GST标签的融合蛋白形式表达,通过蛋白质印迹法进行鉴定。其中图A用于B细胞表位定位的ASFV CP312R片段的示意图;通过两轮重叠PCR鉴定mAb结合表位;图中的数字表示CP312R蛋白和截短片段蛋白中氨基酸(AAs)的位置;图B中M:蛋白质标记,泳道1:1aa-307aa(CP312R),泳道2:1aa-159aa,泳道3:150aa-307aa,泳道4:p30;图C中M:蛋白质标记,泳道5:11aa-86aa,泳道6:21aa-96aa,泳道7:31aa-106aa,泳道8:41aa-116aa,泳道9:51aa-126aa,泳道10:61aa-136aa,泳道11:71aa-146aa,泳道12:81aa-153aa;

图8:通过多序列比对方式对ASFV CP312R蛋白表位序列的保守性分析图;分析时,采用了数据库中八种基因型(包括I、II、IV、VIII、IX、X、X X和X X II基因型)的22种不同ASFV毒株的CP312R蛋白序列,并使用DNASTAR软件对其进行了比较,鉴定的表位序列以红色框突出显示。

具体实施方式

[0011] 下面结合实施例和附图对本发明进行详细的描述。

[0012] 实施例1: 引物的设计及ASFV CP312R蛋白的表达与纯化

[0013] 基于ASFV CP312R基因序列设计了PCR扩增用的引物序列以便基于PCR扩增技术获得该基因序列(以ASFV China/LN/2018/1毒株基因组为模板,引物设计时,增加了BamH I酶切位点)。随后,将扩增所得的ASFV CP312R基因序列重组进入原核表达载体pGEX-6p-1中,并将阳性重组载体转化到大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中:冰上融化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞后,加入1ml预冷的重组质粒溶液,轻轻混匀;冰上放置30min,42℃水浴热激90s,立即置于冰上,冰浴2min,并加入200ml的LB培养液;37℃、200rpm震荡培养30~45min吸取100ml菌液均匀涂布在LB平板上,37℃倒置培养过夜。

[0014] 将上述步骤中转化正确的重组菌株,在LB培养基中,37℃、200rpm条件下培养至OD₆₀₀=0.6~0.8,加入终浓度1mM IPTG,16℃培养16小时,以进行诱导表达获得GST标记的ASFV CP312R蛋白;诱导表达结束后,离心收集菌体,加入裂解缓冲液重悬,冰浴条件下超声破碎以裂解菌体;随后将菌体破碎后的裂解液4℃、10000g离心30min,收集上清液和沉淀进行SDS-PAGE鉴定,随后使用GST标签蛋白纯化试剂盒对上清进行纯化,然后通过SDS-PAGE分析纯化的蛋白质。

[0015] 将洗脱液洗脱下来的溶液用4x protein loading制样,通过SDS-PAGE鉴定,相关

结果如图1所示,CP312R蛋白大小约为35kd,GST标签大小为26kd,从图1上可以看出,蛋白质的分子量约为61kd,与预测的大小一致,主要表达在上清。

[0016] 用纯化后的CP312R重组蛋白进行Western blot分析,以1:50稀释的ASFV阳性血清为一抗,兔抗猪IgG为二抗,结果如图2所示,纯化后的CP312R重组蛋白能与ASFV阳性血清特异性结合,证明纯化后的CP312R重组蛋白的抗原性良好。

实施例2:单克隆抗体的制备与鉴定

[0017] 在实施例1所制备重组蛋白CP312R的基础上,以此作为抗原,进一步利用该重组蛋白对小鼠进行了免疫,并进一步筛选制备获得了特定的单克隆抗体。

[0018] 1、动物免疫

取实施例1所获得的纯化的CP312R蛋白60mg与同等体积的弗氏完全佐剂,用乳化器乳化后,用注射器对4只6~8周龄雌性BALB/c小鼠进行皮下注射,14天后进行二免。二免:用弗氏不完全佐剂与30mg重组蛋白进行乳化,进行皮下注射;14天和28天后进行三免和四免。三免、四免:步骤同二免。四免一周后,对免疫的4只小鼠进行眼眶取血,测其血清效价(图3)。从图中可以看出,2号小鼠血清效价最高,取50mg重组蛋白,对其进行腹腔注射。

[0019] 2、筛选杂交瘤

1) SP2/0细胞的制备

从液氮罐中取出骨髓瘤细胞,37℃下复苏,将融化后的细胞液体转至EP管中,1000r/min,离心10分钟后其去上清,用完全培养基重悬细胞后,转至T75细胞瓶中培养,待细胞长满后备用。

[0020] 2) 饲养细胞的制备

取一只成熟健康的BALB/c小鼠,脱颈处死并浸泡于75%酒精10分钟,固定四肢,剪开皮肤使腹膜暴露,用酒精棉球擦拭腹膜;用10mL注射器,吸取10mL HAT培养基小心注射到腹腔,持酒精棉球轻轻按摩腹部,抽回腹腔内液体,置于50mL无菌离心管中,计数并稀释后加入96孔细胞培养板中。

[0021] 3) 免疫脾脏细胞的制备

取加强免疫后的小鼠,脱颈处死并浸泡于75%酒精10分钟,腹部朝上固定在超净台内的解剖板;无菌打开腹腔取出脾脏,研磨器研磨后,用基础培养基重悬,经细胞筛过滤后去除多余的脂肪组织,1000r/min,离心10分钟后弃去上清,用HAT培养基重悬后备用。

[0022] 4) 细胞融合

将上述制备好的SP2/0骨髓瘤细胞与免疫细胞以1:2的比例在50mL离心管中混匀,1500r/min离心10min,之后倒空上清(可用灭菌的滤纸吸干),轻轻敲击管底,使细胞沉淀略加松动。将装有细胞混合物的离心管置于37℃水浴中。然后在1min内慢慢滴入预温至37℃的融合用PEG 0.8mL,边加边轻轻用吸管尖搅拌。继续搅拌30sec静置1min,然后慢慢加入预温的1640基本培养基10mL。最后缓慢加入30mL 1640基本培养基,1000r/min离心5min,去上清于37℃放置5min~8min。用HAT培养基重悬后,均匀滴入5块96孔细胞培养板中,置于37℃,5%CO₂培养箱中培养。融合后于5d后补加1滴HAT培养基,8~10d时吸去96孔板100ml培养基换HT培养基100ml。待融合细胞集落长至培养孔1/4时,即可进行抗体检测。

[0023] 5) 筛选阳性克隆细胞

利用间接ELISA检测方法进行筛选:包被重组蛋白CP312R,置于4℃过夜,用PBST洗

涤3次,用封闭液进行封闭,将包被板置于37℃温箱,封闭2h,用PBST洗涤3次,随后将杂交瘤细胞上清置于包被板中,同时设置阴、阳性对照,37℃温箱孵育1h,用PBST洗3次,加入工作浓度1:20000的羊抗鼠HRP-IgG,置于37℃,孵育1h,再用PBST洗3次,加入TMB避光显色10min,再加入2M的浓硫酸溶液终止反应,最后读取双波长(450、630)吸光值,并分析结果

将上述步骤中检测孔与阴性对照孔的比值大于1.0的孔进行亚克隆。最终,经三次亚克隆共得到2株阳性的杂交瘤细胞系。最终筛选了一株细胞系能够持续分泌特异性的单克隆抗体且能稳定传代,将该杂交瘤细胞系(Hybridoma cell line)命名为WLB-CP312R-7C11,于2024年3月13日保藏在武汉、武汉大学的中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO: C202440。

实施例3:测定单克隆抗体的序列以及抗体的反应特性

[0024] 制备的单克隆抗体,其重链和轻链的氨基酸和核苷酸序列信息如下:

重链的氨基酸序列如下(112个aa):

DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNWIHQFPGNKLEWWMGYITYSGNTRYNPSLKSRI
SITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAREENWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:1);其可变区CDR的氨基酸
序列分别为GYSITSDYA、ITYSGNT、AREEN,对应的核苷酸序列分别为
GGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCC、ATAACCTACAGTGGTAACACT、GCAAGAGAGGAGAAC。

[0025] 用于编码重链的核苷酸片段的序列如下:

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCAC
TGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCCTGGAACCTGGATCCGGCAATTTCCAGGAAACAACTGGAGTGG
ATGGGCTACATAACCTACAGTGGTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACA
CATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAGA
GGAGAACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCA (SEQ ID NO:2);

轻链的氨基酸序列如下(112个aa):

DVVLVTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGITYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFSGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHWPWF GGGTKLEIK (SEQ ID NO:3);

轻链可变区CDR的氨基酸序列分别为QSLVHSNGITY、KVS、SQSTHWPWT,其对应的核苷酸序列分别为CAGAGCCTTG TACACAGTAA TGG AATCACCTAT、AAAGTTTCC和TCTCAAAGTACACATATTCCGTGGACG。

[0026] 用于编码轻链的核苷酸片段的序列如下:

GATGTTGTGTTGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTG
CAGATCTAGTCAGAGCCTTG TACACAGTAATGGAATCACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCT
CCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGA
CAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATAT
TCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA (SEQ ID NO:4)。

[0027] 根据北京博奥龙公司的抗体亚类鉴定试剂盒对上述的单克隆抗体进行亚型的鉴定,根据其说明书进行操作,结果其如图4所示,单克隆抗体7C11重链亚类为IgG2b,轻链为k型。

[0028] 分别采用蛋白质免疫印迹法(WB)和间接免疫荧光分析(IFA)法测定单克隆抗体的反应特性。

[0029] 蛋白质免疫印迹法具体操作如下:

首先,通过SDS-PAGE电泳分离方法将实施例1所制备的重组蛋白CP312R转移到PVDF膜上;随后在室温下用PBST(含5%BSA)封闭2小时;再用纯化后的单克隆抗体作为一抗进行孵育,4℃震荡孵育过夜;之后用PBST洗涤5次,以山羊抗小鼠IgG HRP抗体为二抗,室温下震荡1小时,再用PBST洗涤5次,最后在化学发光仪中进行显膜。结果如图5所示,PVDF膜上单一条带表明单克隆抗体能特异性识别重组CP312R蛋白。

[0030] 间接免疫荧光分析(IFA)法操作如下:

首先用ASFV感染PAM细胞48h,然后用预冷的80%丙酮在4℃固定并渗透10分钟;在室温下用5%BSA封闭30分钟后;将细胞与单克隆抗体(作为一抗)室温孵育1小时,PBS洗涤3次,再加入用封闭液以1:200稀释的抗小鼠FITC染料标记(作为二抗),黑暗中室温孵育1小时;PBS洗涤3次,再将细胞与DAPI孵育5min,用荧光显微镜观察免疫荧光。结果如图6所示,mAb 7C11能与ASFV感染的PAM细胞中表达的抗原相互作用(有特异性荧光),而模拟对照组细胞中没有荧光。

实施例4:抗原结合表位的鉴定和保守性分析

[0031] 在前述实验结果的基础上,对ASFV CP312R的表位结合位点情况进行了进一步分析。

[0032] (一)ASFV CP312R的表位定位

实验过程中,表达制备了一系列重叠的截短的CP312R片段,以定位单克隆抗体在该蛋白上识别的表位。经过2轮截短,直到最小的结合结构域能够被mAb 7C11识别(图7A所示)。将截短的片段克隆到pGEX-6p-1载体上,并作为融合GST标签蛋白在大肠杆菌细胞中表达。诱导表达结束后,取菌液进行SDS-PAGE电泳检测鉴定,确保表达正确。

[0033] 采用前述实施例2所制备的单克隆抗体,采用WB技术对上述鉴定后表达正确的截短后的蛋白进行鉴定。相关实验结果如图7B、7C所示。结合这些WB检测结果分析,可以看出:肽段117GLTVKKNEQG126与单克隆抗体具有特异性反应。根据定位分析结果,鉴定出1个ASFV CP312R的线性B细胞表位,定位于CP312R蛋白的117GLTVKKNEQG126aa残基。

[0034] (二)已鉴定表位的保守性分析

为了更好地确定ASFV CP312R蛋白的不同ASFV基因型之间鉴定的表位的保守性,使用DNASTAR(版本)将表位117GLTVKKNEQG126与22个参考ASFV毒株(包括I、II、IV、VIII、IX、X、XX、XXII基因型分离株)的序列进行了比较分析。

[0035] 通过序列比对以探索ASFV mAb 7C11的表位(117GLTVKKNEQG126)的保守性水平,结果如图8所示。可以看出,在所有获得的ASFV毒株中(表1),除基因型VIII和X外,鉴定的CP312R蛋白抗原表位在6种ASFV基因型中高度保守。

[0036] 表1:多序列比对方式对ASFV CP312R蛋白表位序列的保守性分析中的病毒信息表

毒株名称	GenBank号	基因型
Pig/HLJ/2018	MK333180.1	II
OURT88/3	AM712240.1	I
ASFV E75	NC_044958.1	I
BA71V	NC001659.2	I
Benin97/1	AM712239.1	I

SD/DY-/21	MZ945537.1	I
DB/LN/2018	MK333181.1	II
WB-964	MT459800.1	II
Georgia 2007/1	FR682468.2	II
AnhuiXCGQ	MK128995.1	II
Estonia/2014	LS478113.1	II
RSA_W1_1999	MN641876.2	IV
SPEC_57	MN394630.3	VIII
ASFV-35	MH025920.1	IX
ASFV-N10	MH025919.1	IX
ASFV-R25	MH025918.1	IX
Ken06.Bus	KM111295.1	IX
Ken05/Tk1	KM111294.1	X
Uvira B53	MT956648.1	X
ASFV-Zaire	MN630494.2	X X
RSA_2_2004	MN641877.2	X X
RSA_2_2008	MN336500.3	X X II

因此,表位117GLTVKKNEQG126可以作为抗原来制备抗体,用于非洲猪瘟病毒的检测后预防治疗。

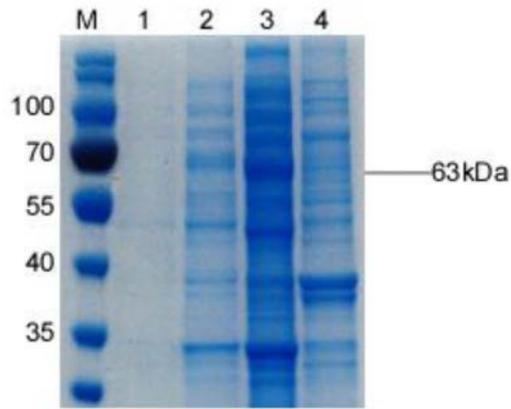


图1

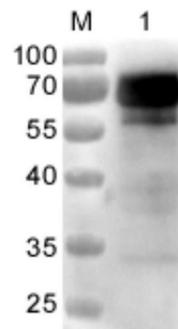


图2

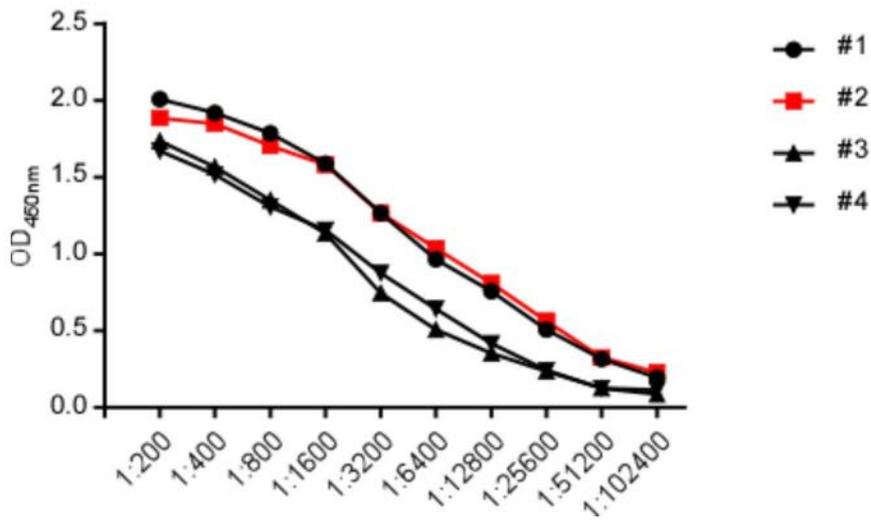


图3

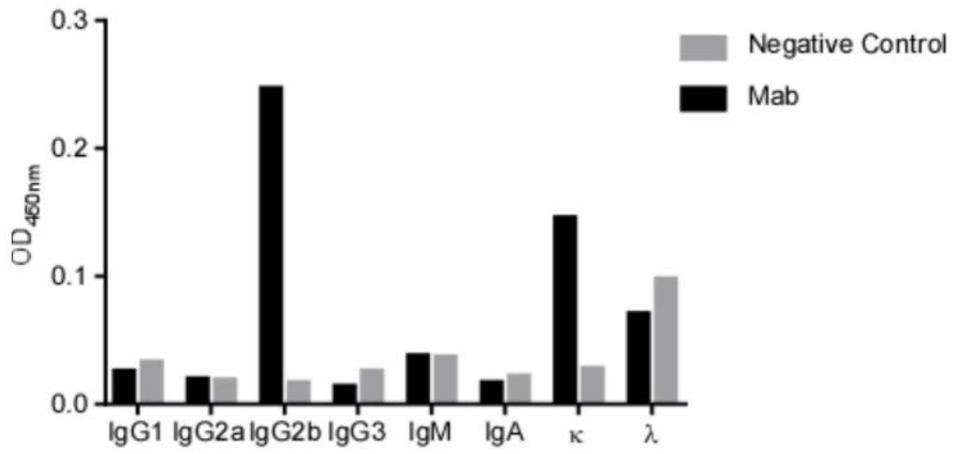


图4

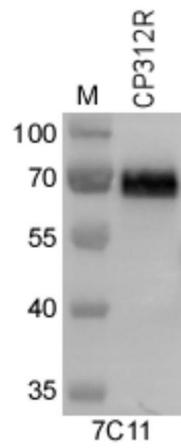


图5

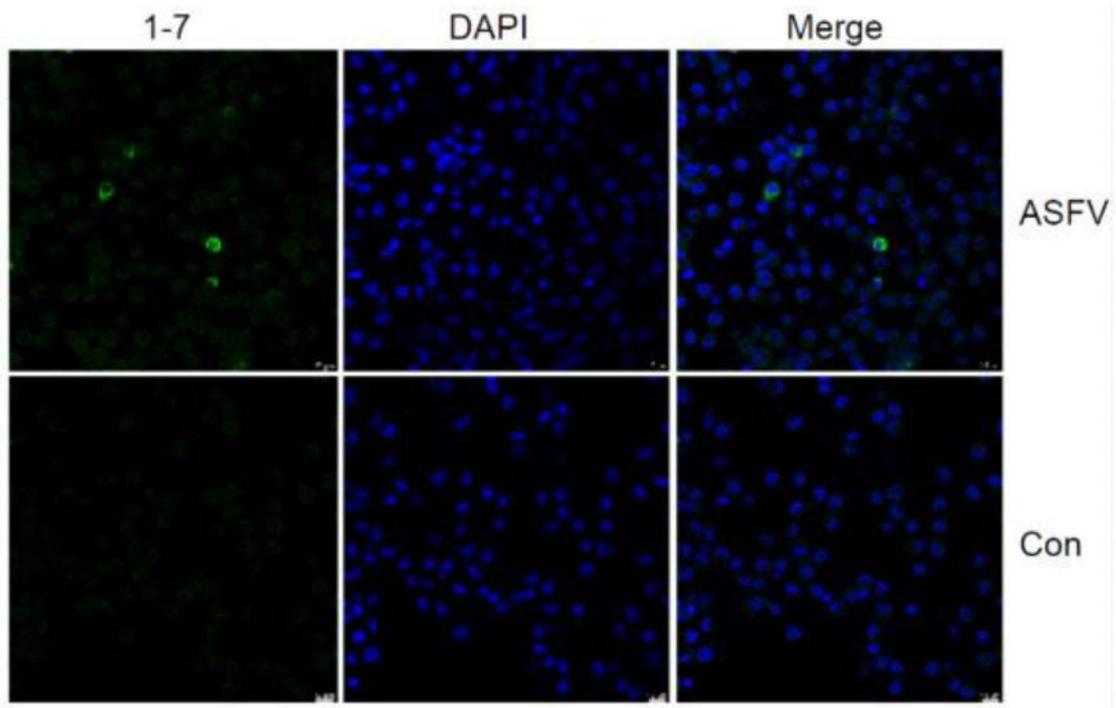


图6

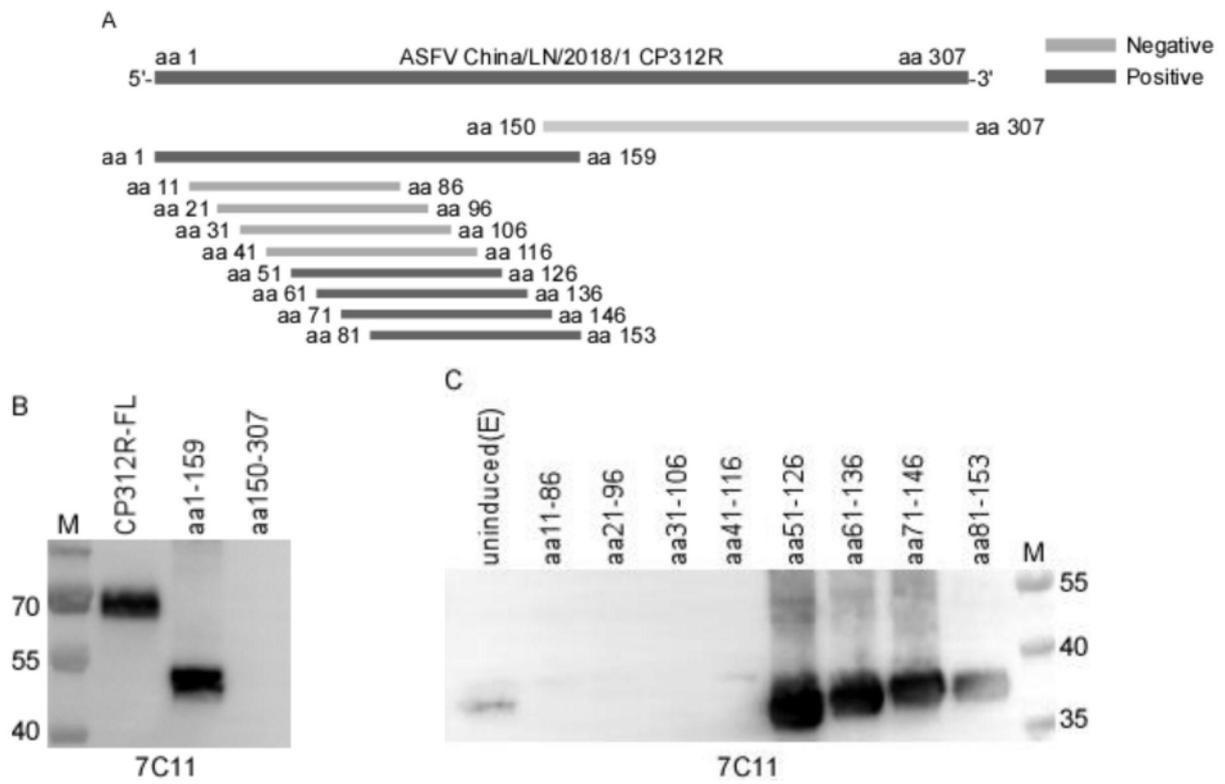


图7

Majority	PSTDEEVIRMNAENPKFLVKKRDRDPCLQFNKYKISPPLEDDGLTVKKNEQGEIYPGDEEKSRLF						
	80	90	100	110	120	130	140
MK333180.1.pro
AM712240.1.pro
NC_044958.1.pro
NC001659.2.pro
AM712239.1.pro
MZ945537.1.pro
MK128995.1.pro
FR682468.2.pro
LS478113.1.pro
MT459800.1.pro
MK333181.1.pro
MN641876.2.pro
MN394630.3.pro	...A...Y.A...Q...T.....V...T.V.A.....M..						
MH025920.1.pro
MH025919.1.pro
MH025918.1.pro
KM111295.1.pro
KM111294.1.pro
MT956648.1.pro	F.....
MN630494.2.pro
MN641877.2.pro
MN336500.3.pro

图8