



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118255877 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 28

(21) 申请号 202410410387.1

(22) 申请日 2024.04.07

(71) 申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所  
(中国动物卫生与流行病学中心兰州分中心)

地址 730046 甘肃省兰州市城关区徐家坪1号

(72) 发明人 肖书奇 马志倩 李志伟 常传哲  
郑海学 李洋 田宏 石正旺  
郑紫方 郭旭阳 冯英桐 刘霄  
徐乐乐

(74) 专利代理机构 北京力量专利代理事务所  
(特殊普通合伙) 11504  
专利代理师 戴治娟

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

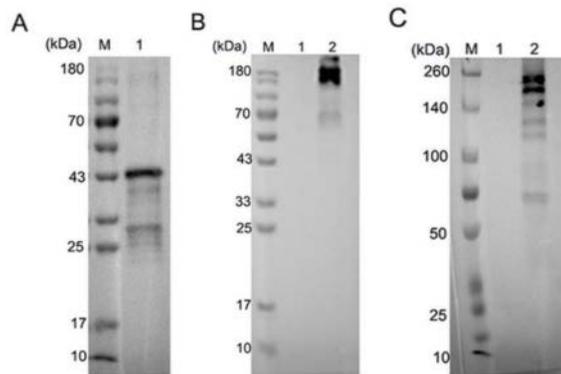
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

一种抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白的单克隆抗体及应用

(57) 摘要

本发明属于免疫学技术领域,具体涉及一种抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白的单克隆抗体及应用。所述的单克隆抗体重链可变区的CDR包括氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的CDR1、氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的CDR2和氨基酸序列如SEQ ID No.3所示的CDR3;轻链可变区CDR包括氨基酸序列如SEQ ID No.4所示的CDR1、氨基酸序列如SEQ ID No.5所示的CDR2和氨基酸序列如SEQ ID No.6所示的CDR3。可以利用常规基因工程或蛋白质工程的方法获得,避免了杂交瘤细胞长期冻存抗体丢失,同样也有利于抗体在基因和蛋白水平上进行优化,进而提高抗体的特异性和亲和力。



1. 一株抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白的单克隆抗体,所述单克隆抗体包括重链恒定区和轻链恒定区、重链可变区和轻链可变区;其特征在于,

所述的单克隆抗体重链可变区的CDR包括氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的CDR1、氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的CDR2和氨基酸序列如SEQ ID No.3所示的CDR3;所述单克隆抗体轻链可变区CDR包括氨基酸序列如SEQ ID No.4所示的CDR1、氨基酸序列如SEQ ID No.5所示的CDR2和氨基酸序列如SEQ ID No.6所示的CDR3。

2. 如权利要求1所述的单克隆抗体,其特征在于,所述的单克隆抗体重链可变区氨基酸序列如SEQ ID No.7所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.8所示。

3. 一种编码权利要求2所述单克隆抗体的基因片段,其特征在于,编码所述单克隆抗体重链可变区的基因序列如SEQ ID No.9所示,编码所述单克隆抗体轻链可变区的基因序列如SEQ ID No.10所示。

4. 含有权利要求3所述基因片段的表达盒、表达载体、重组菌。

5. 权利要求1所述的抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白的单克隆抗体在特异性识别猪流行性腹泻病毒S1蛋白中的应用,其特征在于,所述抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白单克隆抗体能够特异性识别猪流行性腹泻病毒S1氨基酸区域为SEQ ID NO.11所示序列。

6. 如权利要求1或2所述的单克隆抗体在制备检测猪流行性腹泻病毒的试剂,或试纸条,或试剂盒中的应用。

7. 一种猪流行性腹泻病毒双抗夹心ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1或2所述的单克隆抗体。

8. 如权利要求7所述的猪流行性腹泻病毒双抗夹心ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括酶标板、封闭液、稀释液、洗涤液、显色剂、终止液。

## 一种抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白的单克隆抗体及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫学和体外诊断技术领域,具体涉及一种抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白的单克隆抗体、该单抗的识别区域及其应用。

### 背景技术

[0002] 猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的急性、高度接触性传染性传染病,主要症状为呕吐、水样腹泻和脱水。PED发病率高,是目前危害养殖业最严重的疾病之一,每年给全球养猪业带来巨大的经济损失。PEDV能够感染各个年龄段的猪,成年猪主要表现为体重下降和营养不良等症状,但是对于一周龄以内的哺乳仔猪是致死率高达80-100%。

[0003] PEDV属于冠状病毒科的冠状病毒属成员,是一种有囊膜的单股正链RNA病毒, PEDV的基因组长度约为28kb,包括一个5'的帽子端与一个3'端的多聚腺苷酸,共有ORF1a、ORF1b、核衣壳蛋白(N)、膜蛋白(M)、纤突蛋白(S)、包膜蛋白(E)、辅助蛋白(ORF3),7个编码开放阅读框(ORF)。其中, PEDV的纤突蛋白包含多个B细胞表位, S1区域的核心中和表位区域(COE)已经被广泛应用于PEDV亚单位疫苗的开发,例如,发明专利CN117466999A公开了一种猪流行性腹泻病毒单克隆中和抗体,用于检测PEDV S1蛋白,表达PEDV S1全长蛋白的表达质粒和可溶性的PEDV S1蛋白,并对PEDV感染的Huh7细胞展现出良好的中和效果,可基于此制备特异性强的单克隆抗体;发明专利CN115261331A公开了一株抗PEDV S蛋白的单克隆抗体,可用于PEDV检测和PEDV感染机制研究。可见,糖基化纤突蛋白(S)发挥极其重要的免疫学功能。

[0004] 发明人在研究过程中,以PEDV的糖基化纤突蛋白为基础,意外的得到了一种猪流行性腹泻病毒S1前半段蛋白的单克隆抗体,所述的单克隆抗体能够特异性的识别并结合S蛋白的221-262aa,为探究PEDV S蛋白的功能提供了可靠的工具并为PEDV诊断试剂研发提供原材料。

### 发明内容

[0005] 本发明第一方面,提供一种抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白的单克隆抗体,所述单克隆抗体包括重链恒定区和轻链恒定区、重链可变区和轻链可变区;所述的单克隆抗体重链可变区的CDR包括氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的CDR1、氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的CDR2和氨基酸序列如SEQ ID No.3所示的CDR3;所述单克隆抗体轻链可变区CDR包括氨基酸序列如SEQ ID No.4所示的CDR1、氨基酸序列如SEQ ID No.5所示的CDR2和氨基酸序列如SEQ ID No.6所示的CDR3。

[0006] 优选的,所述的单克隆抗体重链可变区氨基酸序列如SEQ ID No.7所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.8所示。

[0007] 本发明的第二方面提供一种编码所述单克隆抗体的基因片段,编码所述单克隆抗体重链可变区的基因序列如SEQ ID No.9所示,编码所述单克隆抗体轻链可变区的基因序

列如SEQ ID No.10所示。所述的抗猪流行性腹泻病毒S1前半段蛋白单克隆抗体重链恒定区为IgG1型,轻链恒定区为Kappa型。

[0008] 本发明的第三方面,提供含有所述基因片段的表达盒、表达载体、重组菌。

[0009] 本发明的第四方面,提供一种抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白单克隆抗体能够特异性识别猪流行性腹泻病毒S1蛋白的区域;上述抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白单克隆抗体能够特异性识别猪流行性腹泻病毒S1蛋白的区域为SEQ ID NO.11所示序列。

[0010] 本发明的第五方面,提供所述的单克隆抗体在制备检测猪流行性腹泻病毒的试剂,或试纸条,或试剂盒中的应用。

[0011] 本发明的第六方面,提供一种猪流行性腹泻病毒双抗夹心ELISA检测试剂盒,所述试剂盒包括所述的单克隆抗体。

[0012] 优选的,所述试剂盒还包括酶标板、封闭液、稀释液、洗涤液、显色剂、终止液。

[0013] 本发明的第七方面,提供一种抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白单克隆抗体的制备方法,通过将猪流行性腹泻病毒S1基因克隆到pET-28a载体中构建出了原核表达载体,诱导表达,尿素变性蛋白后,利用不同浓度咪唑洗脱的方式纯化蛋白,将纯化后的S1重组蛋白作为抗原免疫Balb/c小鼠,取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0细胞进行融合,制备杂交瘤细胞,将细胞上清进行间接ELISA和间接免疫荧光验证,筛选得到阳性克隆,经过三次亚克隆后,将杂交瘤细胞注射小鼠进行腹水的制备,最后将得到的腹水进行纯化,得到抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白单克隆抗体。

[0014] 本发明的有益效果为:本发明利用原核表达系统表达并纯化重组PEDV S1前半段蛋白,以此作为免疫源免疫小鼠,通过细胞融合和亚细胞筛选,成功获得一株针对S1前半段蛋白的单克隆抗体。将S1前半段基因截短表达,发现该抗体能特异性识别并结合S1前半段蛋白的区域为221-262aa,为探究S1蛋白的功能提供了可靠的研究工具。

[0015] 本发明提供的单克隆抗体,可以利用常规基因工程或蛋白质工程的方法获得,避免了杂交瘤细胞长期冻存抗体丢失,同样也有利于抗体在基因和蛋白水平上进行优化,进而提高抗体的特异性和亲和力。本发明制备的单克隆抗体能够同时识别G1型和G2型PEDV,保守性良好,本发明制备的单克隆抗体为PEDV致病机制的研究以及为PEDV诊断试剂盒的研制提供了材料。

## 附图说明

[0016] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图获得其他的附图。

[0017] 图1PEDV S1前半段基因PCR扩增及pET-28a质粒双酶切鉴定结果

[0018] 注:A图中M:250bp DNA Ladder相对分子质量标准;1:S1前半段基因,大小为1227bp;B图中M:250bp DNALadder相对分子质量标准;1:pET-28a重组质粒用Nco I和Xho I双酶切。

[0019] 图2pET-28a-S1前半段重组蛋白表达以及纯化结果

[0020] 注:A图中M:蛋白Marker;1:未诱导全菌液;2:诱导全菌液;3:超声破碎后上清;4:

超声破碎后沉淀;B图中M:蛋白Marker;1:纯化的重组S1前半段蛋白。

[0021] 图3S蛋白三免后小鼠血清效价检测

[0022] 注:1~3:1、2和3号免疫鼠,NC:阴性对照

[0023] 图4单克隆抗体效价测定

[0024] 图5IFA鉴定单克隆抗体的反应性

[0025] 注:A. IFA鉴定单克隆抗体与G1型PEDV毒株反应性;B. IFA鉴定单克隆抗体与G2型PEDV毒株反应性;C. IFA鉴定单克隆抗体与未接毒细胞反应性

[0026] 图6Westernbolt鉴定单克隆抗体的反应性

[0027] 注:A图为C1A单克隆抗体与纯化的重组S1前半段蛋白反应性;M:蛋白Marker;1:纯化的S1前半段蛋白;

[0028] B图为C1A单克隆抗体与G1型PEDV毒株反应性;M:蛋白Marker;1:未接毒Vero细胞;2:G1型PEDV病毒感染Vero细胞;

[0029] C图为C1A单克隆抗体与G2型PEDV毒株反应性;M:蛋白Marker;1:未接毒Vero细胞;2:G2型PEDV感染Vero细胞。

[0030] 图7C1A单克隆抗体亚类鉴定结果

[0031] 图8抗体识别S蛋白区域鉴定结果

[0032] 注:A图为S1前半段蛋白截短表达示意图;

[0033] B图为L1、L2和L3区诱导表达后SDS-PAGE鉴定结果。M:蛋白marker;1:L1未诱导表达全菌;2:L1诱导表达全菌;3:L2未诱导表达全菌;4:L2诱导表达全菌;5:L3未诱导表达全菌;6:L3诱导表达全菌。

[0034] C图为C1A Western blot鉴定结果。M:蛋白marker;1:L1诱导表达全菌;2:L2诱导表达全菌;3:L3诱导表达全菌。

[0035] D图为将L2基因截短表达示意图;

[0036] E图为L2.1、L2.2、L2.3和L2.4基因诱导表达后SDS-PAGE鉴定结果。M:蛋白marker;1:L2.1未诱导表达全菌;2:L2.1诱导表达全菌;3:L2.2未诱导表达全菌;4:L2.2诱导表达全菌;5:L2.3未诱导表达全菌;6:L2.3诱导表达全菌;7:L2.4未诱导表达全菌;8:L2.4诱导表达全菌。

[0037] F图为C1A Western blot鉴定结果。M:蛋白marker;1:L2.1诱导表达全菌;2:L2.2诱导表达全菌;3:L2.3诱导表达全菌;4:L2.4诱导表达全菌。

[0038] 图9可变区PCR扩增结果

[0039] 注:A图为重链可变区PCR扩增结果。M:250bp DNALadder;1:C1A重链可变区PCR扩增。B图为轻链可变区PCR扩增结果。M:250bp DNALadder;1:C1A轻链可变区PCR扩增。

## 具体实施方式

[0040] 下面通过具体实施方式对本发明作进一步详细说明。但本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明和解释本发明,而不应视为限定本发明的保护范围。另外,实施例中未注明具体技术操作步骤或条件者,均按照本领域内的一般文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

- [0041] 实施例一、一种抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白的单克隆抗体的制备  
 [0042] 1. PEDV S1蛋白前半段重组质粒的构建  
 [0043] 1.1引物设计  
 [0044] 表1PCR引物

基因名称	引物名称	引物序列	酶切位点
PEDV S1 前半段	S1-F	TAAGAAGGAGATATACCATGGCGCCGCAA	<i>Nco</i> I
		GACGTTACCCGTTGTAGCG	
PEDV S1 前半段	S1-R	GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGGCCGG	<i>Xho</i> I
		TAAAGTTAATGGTAACCGCG	

- [0046] 表1中下划线部分为酶切位点,引物序列由北京擎科生物科技股份有限公司合成。  
 [0047] 1.2PEDV S1前半段基因扩增  
 [0048] 利用本实验室保存的pGEX-6P-2-S1质粒扩增PEDV S1前半段片段,PCR扩增体系和扩增程序如下(见表2和表3)  
 [0049] 表2PCR扩增体系

试剂	体积
2xPhanta Max Master Mix	25 $\mu$ L
S1-F	1.5 $\mu$ L
S1-R	1.5 $\mu$ L
质粒	2 $\mu$ L
DdH <sub>2</sub> O	Up to 50 $\mu$ L

- [0051] 表3PCR扩增程序

	温度	时间	循环
预变性	95°C	3 min	1X
变性	95°C	15 s	
退火	56°C	15 s	30X
延伸	72°C	1 min	
终延伸	72°C	5 min	1X

- [0053] PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。  
 [0054] 1.3重组质粒构建  
 [0055] pET-28a载体用*Nco* I与*Xho* I双酶切后,双酶切载体与S1前半段基因PCR胶回收产物进行连接再转化至DH5 $\alpha$ 感受态细胞中。将构建好的重组质粒进行菌液PCR,鉴定为阳性的菌液送北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。  
 [0056] 2.重组蛋白的诱导表达与纯化及血清效价测定  
 [0057] 2.1重组蛋白的诱导表达与纯化

[0058] 将重组质粒pET-28a-S1前半段转化至大肠杆菌BL21 (DE3) 中,挑取单菌落于1mL卡纳抗性的LB中摇菌过夜,次日将菌液按照1:100接入10mL卡纳抗性的培养基中,37°C,220rpm/min,约3h后,待OD<sub>600</sub>值在0.6-0.8之间时,加入终浓度为1mmol/L的IPTG进行诱导表达。诱导6h后,8000rpm离心5min收集沉淀,沉淀用10mL PBS重悬后,进行超声处理5min(超3s,停3s),超声后4°C,12000rpm离心10min,分别收集上清和沉淀,沉淀使用大约10mL的8M尿素室温溶解3h,在上清液和沉淀中分别加入2×loading buffer,置电热炉上100°C,10min,再进行SDS-PAGE鉴定。

[0059] 按照上述方法扩大培养pET-28a-S1前半段蛋白的诱导表达量,取超声后细菌沉淀,8M尿素在4°C溶解过夜,在与镍柱孵育过夜后,进行镍柱纯化。具体操作步骤如下:

[0060] a. 装柱:在纯化管中加入镍柱NTA树脂2mL,用5倍柱体积蒸馏水清洗柱子一次,然后用5倍柱体积平衡液(8M Urea,10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,10mM Tris base,pH=8.6)对柱子进行平衡两次;

[0061] b. 上样:蛋白样品在上样时需要用0.45μm的滤器进行过滤,而后与镍柱混匀,装至50mL离心管4°C孵育过夜,次日进行纯化,收集样品各种梯度的洗脱液,最后使用5倍柱体积的平衡液冲洗柱子2次,再将镍柱中加入20%乙醇,4°C保存;

[0062] c. 蛋白洗脱:用平衡液配置不同浓度咪唑(10mM,50mM,100mM,250mM,500mM,1M和2M)对蛋白样品进行洗脱,每次10mL,其目的是为了确定咪唑的最佳洗杂浓度和蛋白洗脱浓度;

[0063] d. SDS-PAGE鉴定:将样品处理后跑蛋白胶,确定最佳洗脱浓度。

[0064] e. 蛋白透析:将纯化的蛋白进行梯度透析,设置平衡缓冲液的透析梯度为(6M Urea,5M Urea,4M Urea,3.5M Urea)。

[0065] 2.2ELISA方法检测小鼠血清多抗效价

[0066] 将蛋白包被在ELISA板上,包被浓度为200ng/孔,时间为37°C两小时,再使用PBS' T洗四遍,拍干,加入5%脱脂奶粉37°C封闭2h。将阳性血清和阴性血清用PBS' T倍比稀释,稀释梯度从1:1000至1:128000,设置8个梯度,37°C静置1h,PBS' T洗四遍,加入HRP标记的山羊抗鼠IgG(1:10000稀释),PBS' T洗四遍,拍干,TMB显色15min,再加入中止液,置酶标仪上测定OD<sub>450nm</sub>。

[0067] 3. 单克隆抗体的制备、反应性及可变区序列测定

[0068] 3.1动物免疫

[0069] 选取6周龄雌性BALB/c小鼠3只,将纯化的S1前半段重组蛋白按50μg/只的量免疫小鼠。首次免疫,将S1前半段蛋白与博奥龙水佐剂等体积混匀后,采用皮下注射免疫小鼠(背部两个点)。首免后21天进行加强免疫,共免疫三次,三免后14天眼球采血测定抗体效价,在融合前进行加强免疫,将S1前半段重组蛋白按照30μg/只,对将要进行细胞融合的小鼠进行腹腔注射。

[0070] 3.2单克隆抗体的制备

[0071] 具体操作步骤如下:

[0072] (1) 细胞融合:将脾细胞和适量的SP2/0细胞在融合剂PEG作用下进行细胞融合。融合后的细胞铺在96孔板中,培养基中含有博奥龙添加因子。

[0073] (2) 阳性克隆的筛选:

[0074] a) 间接ELISA检测,将纯化的S前半段重组蛋白包被ELISA板,检测融合细胞分泌抗体的情况。

[0075] b) 间接免疫荧光 (IFA) 检测,将ELISA抗体阳性细胞孔中的上清,加入PEDV感染Vero细胞中,然后加入FITC标记的山羊抗鼠IgG,反应完毕后置荧光显微镜下观察结果。

[0076] (3) 阳性杂交瘤细胞的亚克隆:选取ELISA和IFA均为阳性的孔,采用有限稀释法对筛选到的阳性杂交瘤细胞进行亚克隆。10天后,在倒置显微镜下观察,标出只有单个克隆生长的孔,取上清,利用上述ELISA和IFA方法进行抗体检测。阳性细胞进入下一轮的亚克隆,共进行三次。

[0077] (4) 腹水的制备:取10~12周的BALB/c雌性小鼠,每只小鼠腹腔博奥龙腹水制备专用佐剂0.5mL,10天后每只小鼠腹腔注射 $5 \times 10^5$ 个杂交瘤细胞(0.5mL),7~10天后,鼠体腹腔明显隆起,采集腹水,-80°C保存。

[0078] (5) 腹水的纯化:按照全式金公司 *ProteinIso*®Protein G Resin进行亲和层析纯化,经SDS-PAGE电泳鉴定抗体纯度。

[0079] 3.3单克隆抗体反应性鉴定

[0080] (1) 反应性验证:包括ELISA、IFA及Western blot验证。

[0081] a) ELISA验证纯化的抗体效价:将纯化的S1前半段重组蛋白包被ELISA板,200 $\mu$ L/孔,37°C包被2h,用PBS' T洗四遍,加入5%脱脂奶粉37°C封闭2h用PBS' T洗四遍,加入倍比稀释的C1A单克隆抗体,37°C作用1h,PBS' T洗四遍,加入HRP标记的山羊抗鼠IgG(1:8000稀释),PBS' T洗四遍,TMB显色15min,再加入中止液,置酶标仪上测定OD<sub>450nm</sub>。

[0082] b) IFA验证抗体反应性:将G1型PEDV和G2型PEDV毒株分别感染的Vero细胞,以及未接毒的Vero细胞用多聚甲醛室温固定细胞15min,再使用1%的曲拉通室温破膜15min,纯化的抗体用5%脱脂奶粉(PBS)1:500稀释后,再加入到细胞板中37°C孵育1h,PBS洗三遍,随后37°C孵育FITC-抗鼠二抗(1:500稀释)1h,再使用PBS洗三遍,置荧光显微镜下观察。

[0083] c) Western blot验证抗体反应性:取纯化的S1前半段重组蛋白以及收集病毒感染和未感染的Vero细胞跑SDS-PAGE,随后将蛋白胶转移至NC膜上,进行Western blot验证,一抗为稀释的C1A单克隆抗体,二抗为HRP标记的抗鼠IgG。

[0084] (2) 单克隆抗体亚类鉴定:按照Proteintech公司的Mouse Monoclonal Antibody Lsotyping Kit抗体亚类鉴定试剂盒操作说明对所获得的单抗进行抗体亚类鉴定。

[0085] (3) 表位鉴定:将S1基因截短后克隆至原核表达载体上,诱导表达后跑SDS-PAGE,并将其转移至NC膜上,通过Western blot验证单克隆抗体的反应性,从而确定单克隆抗体识别的抗原表位,继续进行截断,按照相同的方法进一步缩短了抗原识别位点。

[0086] 3.4单克隆抗体可变区基因PCR扩增与序列测定

[0087] 首先提取单克隆抗体杂交瘤细胞RNA,利用诺唯赞公司的HiScript IIQ RT SuperMix for qPCR反转录试剂盒分别将其逆转录合成cDNA。

[0088] 抗体可变区基因采用套式PCR扩增。首先以上述cDNA为模板,利用第一轮鼠源抗体IgG1及 $\kappa$ 轻链引物扩增抗体可变区基因,然后以第一轮产物为模板,利用第二轮鼠源抗体IgG1及 $\kappa$ 轻链引物扩增抗体可变区基因。PCR反应体系与程序如下(表4和表5):

[0089] 表4PCR扩增抗体可变区

		试剂	体积		
[0090]		2xPhanta Max Master Mix	25 $\mu$ L		
		预混引物-F	1.5 $\mu$ L		
		预混引物-R	1.5 $\mu$ L		
		片段	2 $\mu$ L		
		DdH <sub>2</sub> O	Up to 50 $\mu$ L		
[0091]	表5PCR扩增程序				
		温度	时间	循环	
[0092]		预变性	95°C	3 min	1X
		变性	95°C	15 s	
		退火	56°C	15 s	30X
		延伸	72°C	30 s	
		终延伸	72°C	5 min	1X

[0093] 抗体可变区基因扩增的引物参照文献 (Von Boehmer L, Liu C, Ackerman S, et al. Sequencing and cloning of antigen-specific antibodies from mouse memory B cells. Nat Protoc. 2016; 11(10):1908-1923.)

[0094] 扩增完成后进行1%琼脂糖凝胶电泳,重链、轻链可变区基因大小约为300bp,切胶回收目的片段。将回收的目的片段插入pMD-19T载体中,送北京擎科生物科技股份有限公司进行序列测定。

[0095] 4. 结果

[0096] 4.1S前半段基因的扩增及pET-28a双酶切

[0097] 以pGEX-6P-2-S1为模板,扩增S1前半段基因,PCR产物经过1%琼脂糖凝胶电泳,结果如图1A所示,S1前半段片段大小约为1227bp。

[0098] 将pET-28a载体使用Nco I与Xho I双酶切后结果如图1B所示,再进行载体的构建,测序结果证实序列正确,无碱基错配。重组质粒命名为pET-28a-S1前半段。

[0099] 4.2S1前半段重组蛋白的诱导表达与纯化及血清效价测定

[0100] 重组质粒pET-28a-S1前半段转化至大肠杆菌BL21 (DE3) 中,加入终浓度为1mmol/L的IPTG进行诱导表达,诱导产物超声处理后进行SDS-PAGE鉴定,结果显示pET-28a-S1前半段在沉淀中大量表达(图2A),说明S1前半段重组蛋白为包涵体的形式存在,超声后沉淀使用8M尿素变性蛋白,再采用镍柱纯化方法对该蛋白进行纯化。由图2B可见,获得了纯度较高的S1前半段重组蛋白。纯化的S1前半段重组蛋白免疫Balb/c小鼠,共免疫三次,随后进行抗体效价检测。用S1重组蛋白包被ELISA板,检测抗体效价,以未免疫小鼠血清作为阴性对照(NC),结果显示,血清1:64000稀释时,1、2和3号免疫鼠OD<sub>450nm</sub>/NC $\geq$ 2.1,说明该抗体效价能达到1:64000以上(图3)。

## [0101] 4.3单克隆抗体反应性检测

[0102] 通过细胞融合技术,筛选得到特异性识别PEDV S蛋白的单克隆抗体,将其命名为C1A。ELISA鉴定结果如图4所示,这株单抗与S1重组蛋白反应,且效价比较高。

[0103] IFA结果如图5所示,由图5A和5B可知,C1A作用与G1型PEDV和G2型PEDV毒株感染的Vero细胞都能够检测到特异性的绿色荧光信号,由图5C可知,未接毒的Vero细胞与C1A不反应。

[0104] Western blot验证结果如图6所示,由图6A所示,C1A与纯化的S1前半段重组蛋白能特异性结合,由图6B和图6C所示,C1A抗体可以与G1型和G2型PEDV发生特异性结合,而与未接毒的Vero细胞不反应。

## [0105] 4.4单克隆抗体亚类鉴定

[0106] 按照小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒对C1A单抗进行亚型鉴定,鉴定结果如图7所示,C1A单抗重链恒定区为IgG1型,它们的轻链恒定区为Kappa型。

## [0107] 4.5单克隆抗体识别S1前半段重组蛋白区域的鉴定

[0108] 为了鉴定单克隆抗体识别S1前半段重组蛋白的区域,将S1前半段重组蛋白进行如图8A所示进行基因的截短,分别命名为L1、L2和L3。将其插入原核表达载体pMAL-C2X中,结果如图8B所示,L1、L2和L3区域均能表达。Western blot结果如图8C所示,C1A单抗与L2区反应,不与L1和L3区反应,说明C1A识别S1前半段蛋白的区域是L2区域,即154-296aa。将L2区进一步截短表达(图8D),如图8E和8F所示,C1A单抗识别L2.3区,不能识别L2.1、L2.2和L2.3区,说明C1A识别S1前半段蛋白的区域是L2.3区域,即221-262aa,如SEQ ID NO.11所示。

## [0109] 5.4单克隆抗体可变区PCR扩增

[0110] 单克隆抗体可变区PCR扩增结果如图9所示,从C1A杂交瘤细胞cDNA中扩增得到大小约为300bp的PCR产物,图9A为扩增C1A轻链可变区基因,图9B为扩增C1A重链可变区基因结果,与预期扩增产物大小一致;切胶回收后,克隆至pMD19-T载体测序。

[0111] 将测序结果与抗体基因库(IMG)进行比对分析,测序结果证实扩增得到的序列为单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区的互补决定区(complementarity determining region,CDR)序列如表6所示。

## [0112] 表6抗体可变区序列

	CDR1	CDR2	CDR3
[0113] 重链可变区	DYAMH	VISPYHGYTSYNQKFKG	GWVDYWGQG
轻链可变区	HMYSYGSTSVKSAR	SELNSVL	LVIDIELPD

[0114] 其中,重链可变区的氨基酸序列为:

[0115] GEYCGRRLGFEVQLQESGAELVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLE WIGVISPYHGYTSYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYFCARGWVDYWGQ GTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQ TNSMVTLGCLVKGYFPEQSLEDPRVPSSNS;

[0116] 轻链可变区的氨基酸序列为:

[0117] MTMITNSSSVPGDPLEIDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQ KPGQPPRL LIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPS WK;

[0118] 编码重链可变区的基因序列为:

[0119] GGCGAATACTGCGGTCGACGATTGGGATTTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAG GCCTGGGGTCTCAGTGAAGATTCCTGCAAGGGATCTGGCTACACATTCACTGATTATGCTATGCACTGGGTGAAG CAGAGTCATGCAAAGAGTCTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTCCTTACCATGGTTATACTTCCTACAATCAGAAGT TCAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTATATGGAAGTGGCAGACTGACATCTGA GGATTCTGCCATCTATTTCTGTGCAAGAGGCTGGGTGGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCTCA GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGG GATGCCTGGTCAAGGGCTACTTCCCTGAGCAATCTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGTAA;

[0120] 编码轻链可变区的基因序列为:

[0121] TTATTTCCAGCTTGGTCCCCCTCCGAACGTGTAAGCTCCCTAATGTGCTGACAGTAATAGGTTGCAG CATCCTCCTCCTCCACAGGATGGATGTTGAGGGTGAAGTCTGTCCCAGACCCACTGCCACTGAACCTGGCAGGGAC CCCAGATTCTAGGTTGGATACAAGATAGATGAGGAGTCTGGGTGGCTGTCTGGTTTCTGTTGGTTCCAGTGCATA TAACTATAGCCAGATGTAAGTACTGACACTTTTGTGCTGGCCCTGTATGAGATGGTGGCCCTCTGCCCCAGAGATACAGCTA AGGAAGCAGGAGACTGTGTCAGCACAATGTCAATCTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCAT GGTCAT。

[0122] S蛋白单克隆抗体能够特异性识别猪流行性腹泻病毒S蛋白的区域为:GEDGISYQP CTANCIGYAANVFATEPNGHIPEGFSFNNWFL

[0123] 综上所述,本发明提供了一种抗猪流行性腹泻病毒S1蛋白的单克隆抗体,所述的单克隆抗体能够特异性的识别并结合S蛋白的221-262aa,为探究S蛋白的功能提供了可靠的工具。本发明提供的单克隆抗体,可以利用常规基因工程或蛋白质工程的方法获得,避免了杂交瘤细胞长期冻存抗体丢失,同样也有利于抗体在基因和蛋白水平上进行优化,进而提高抗体的特异性和亲和力。本发明制备的单克隆抗体为PEDV致病机制的研究以及为PEDV诊断试剂盒的研制提供了材料。

[0124] 以上所述之实施例,只是本发明的较佳实施例而已,并非限制本发明的实施范围,故凡依本发明专利范围所述的构造、特征及原理所做的等效变化或修饰,均应包括于本发明申请专利范围内。

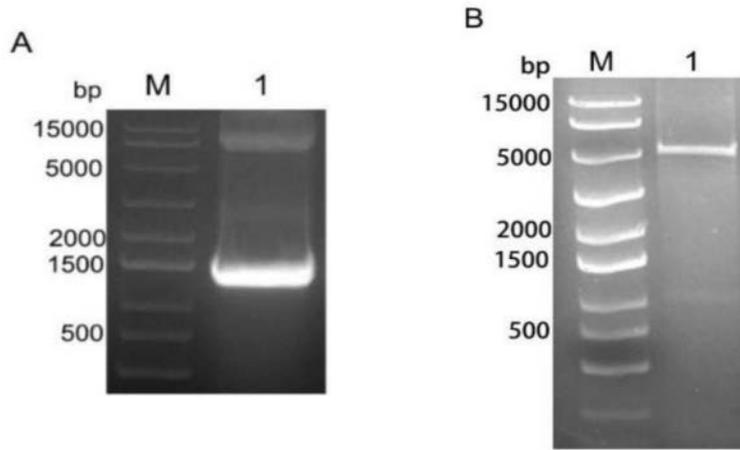


图1

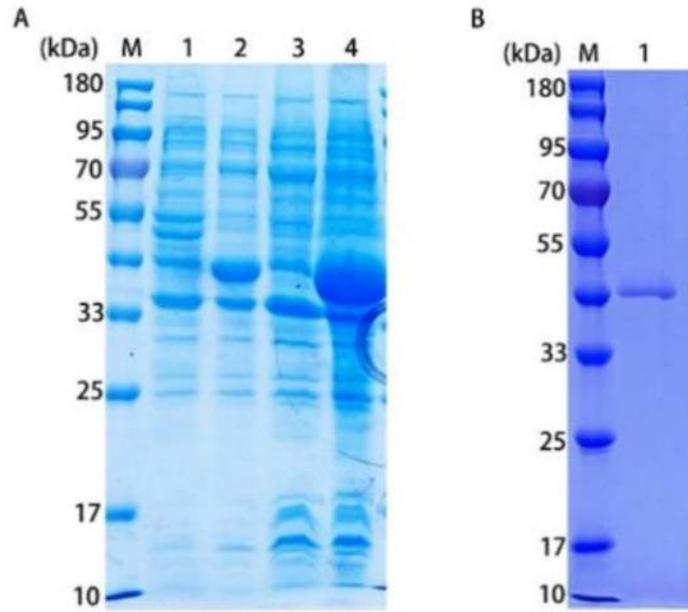


图2



图3

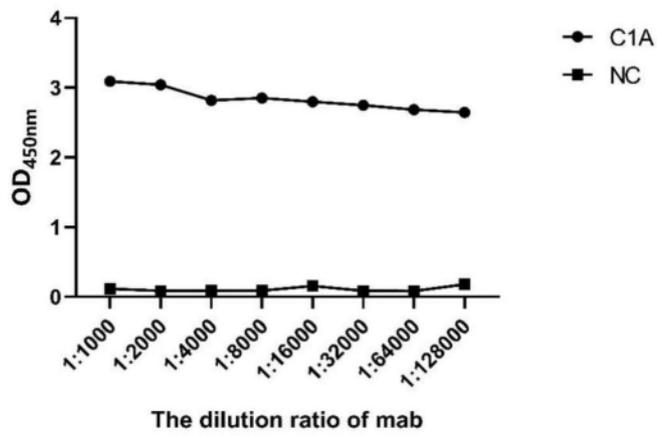


图4

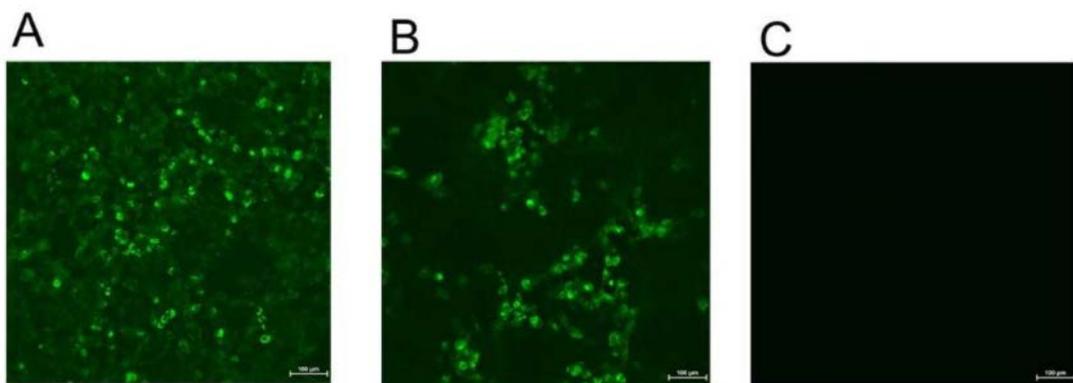


图5

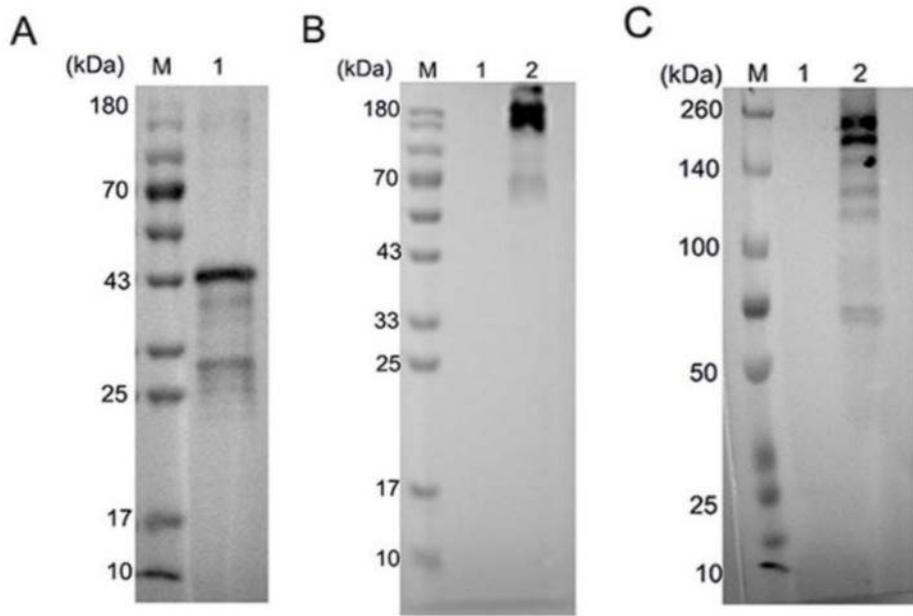


图6

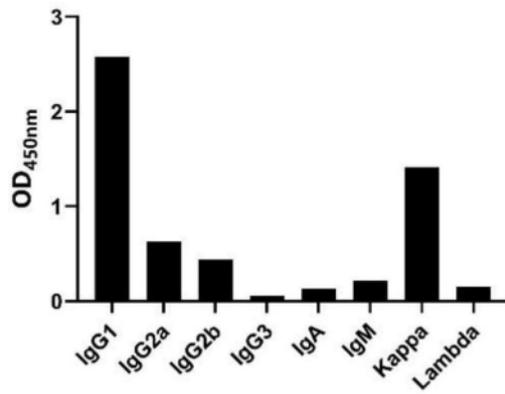


图7

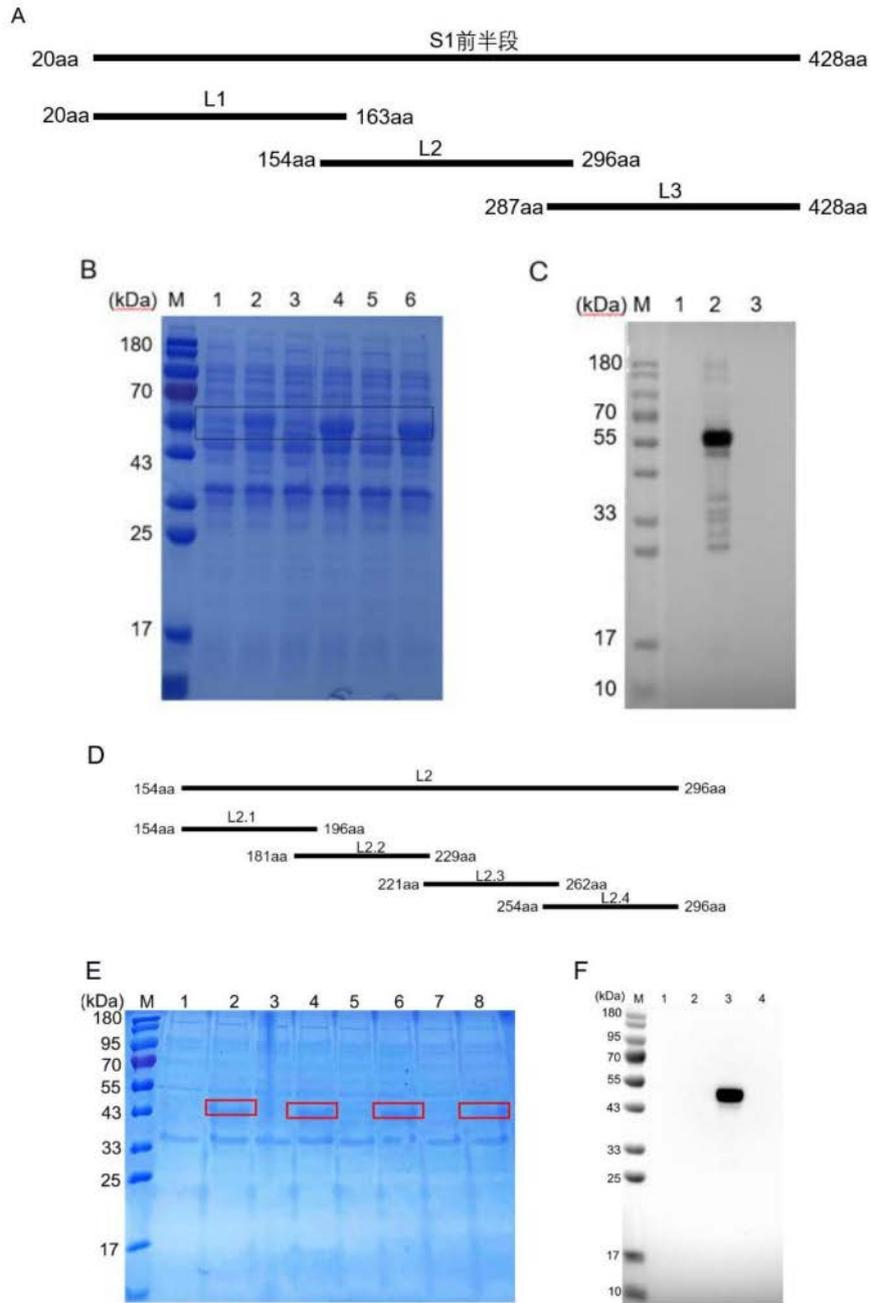


图8

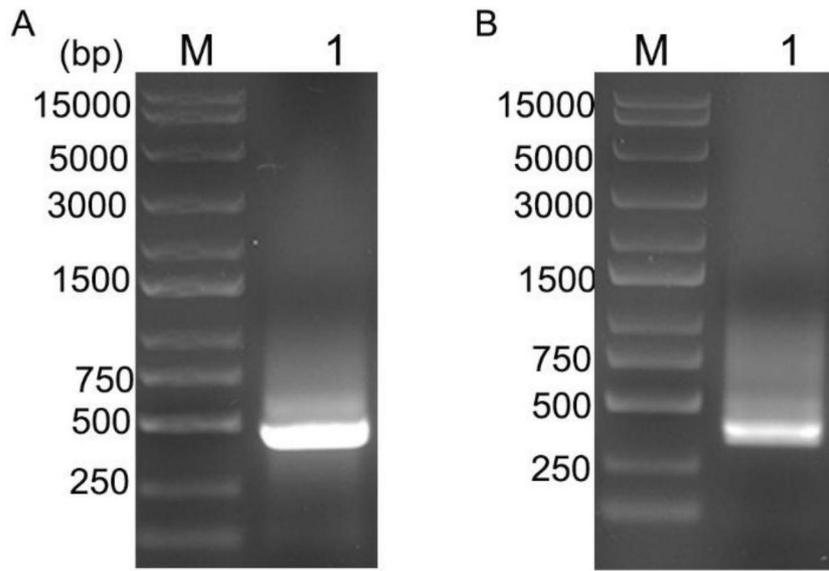


图9