



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116751286 A

(43) 申请公布日 2023.09.15

(21) 申请号 202310307286.7

(22) 申请日 2023.03.27

(71) 申请人 厦门同仁心生物技术有限公司

地址 361026 福建省厦门市海沧区后祥路
71号厦门生物医药产业协同创新创业
中心4号楼

(72) 发明人 张涛 邹柳 洪明凤 盛布恩
张松 周国栋

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

权利要求书2页 说明书11页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体对
及其应用

(57) 摘要

本申请涉及生物医学的技术领域,具体公开了一种抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体对及其应用。所述单克隆抗体对包括两个单克隆抗体;所述单克隆抗体包括重链可变区和轻链可变区;所述单克隆抗体对中的一个单克隆抗体命名为7E8C9抗体,另一单克隆抗体命名为10H1C7抗体。本申请还公开了编码上述单克隆抗体的核酸分子以及分泌上述单克隆抗体的杂交瘤细胞株。此外,本申请还公开了包括上述单克隆抗体对的检测新型冠状病毒的检测试剂盒,其中,7E8C9抗体作为捕获抗体,10H1C7抗体作为标记抗体。本申请提供的抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体对对新型冠状病毒N蛋白具有较好的特异性。

1. 一种抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体对,其特征在于,

所述单克隆抗体对包括两个单克隆抗体;所述单克隆抗体包括重链可变区和轻链可变区;所述重链可变区包括重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;所述轻链可变区包括轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;

所述单克隆抗体对中的一个单克隆抗体命名为7E8C9抗体,序列信息如下:

所述重链CDR1包括如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:1所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

所述重链CDR2包括如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:2所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

所述重链CDR3包括如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:3所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

所述轻链CDR1包括如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:4所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

所述轻链CDR2包括如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:5所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

所述轻链CDR3包括如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:6所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

所述单克隆抗体对中的另一个单克隆抗体命名为10H1C7抗体,序列信息如下:

所述重链CDR1包括如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:7所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

所述重链CDR2包括如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:8所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

所述重链CDR3包括如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:9所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

所述轻链CDR1包括如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:10所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

所述轻链CDR2包括如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:11所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

所述轻链CDR3包括如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:12所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体对,其特征在于,所述7E8C9抗体中,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列;所述10H1C7抗体中,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

3. 一种核酸分子,其特征在于,所述核酸分子编码权利要求1或2所述的单克隆抗体的氨基酸序列。

4. 根据权利要求3所述的核酸分子,其特征在于,所述核酸分子编码7E8C9抗体重链可变区的序列包括如SEQ ID NO:17所示的核苷酸序列,所述核酸分子编码单克隆抗体轻链可变区的序列包括如SEQ ID NO:18所示的核苷酸序列;所述核酸分子编码10H1C7抗体重链可

变区的序列包括如SEQ ID NO:19所示的核苷酸序列,所述核酸分子编码单克隆抗体轻链可变区的序列包括如SEQ ID NO:20所示的核苷酸序列。

5.一种抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株,其特征在于,所述杂交瘤细胞株分泌权利要求1或2所述的单克隆抗体。

6.一种检测新型冠状病毒的检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒包括权利要求1或2所述的抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体对。

7.根据权利要求6所述的检测新型冠状病毒的检测试剂盒,其特征在于,所述7E8C9抗体作为捕获抗体,所述10H1C7抗体作为标记抗体。

8.一种权利要求1或2所述的单克隆抗体对、权利要求3或4所述的核酸分子或权利要求6或7所述的检测新型冠状病毒的检测试剂盒在制备检测新型冠状病毒N蛋白抗原试剂中的应用。

一种抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体对及其应用

技术领域

[0001] 本申请涉及生物医学的技术领域,更具体地说,涉及一种抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体对及其应用。

背景技术

[0002] 目前,新型冠状病毒检测主要有两种方法:核酸PCR检测(检测病毒RNA)和抗原快速检测(检测病毒蛋白)。核酸PCR检测灵敏度高,是检测金标准。但核酸检测耗时长(4-6h),同时还需要配合专业人员的操作以及匹配昂贵的PCR设备。新型冠状病毒抗原层析检测纸条,具有耗时短(10-30min)、不需要专业人员操作、不需要特殊设备的优点,可以用于基层医疗机构和家庭自测市场。

[0003] 免疫层析检测技术是20世纪90年代出现的新兴免疫检测技术,其特点是应用抗原-抗体免疫学反应和层析反应,并以干片法试纸的形式,达到快速、准确地显色以检测待测物的目的。新型冠状病毒抗原层析检测纸条的原理是预先在试纸条的检测线(T线)上包被固定抗体,结合垫带有免疫标记的探针。一般探针为胶体金、乳胶粒子或荧光微球等具有比色或荧光信号的微颗粒。在样品垫中加入待测样本,样本流至结合垫时,通过抗原-抗体相互作用与探针结合,形成样本-探针复合物。当流动至T线时,复合物会被T线上的抗体捕获,形成标记三明治夹心结构复合物,使T线显色。

[0004] 新型冠状病毒核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein,N蛋白)是感染中主要表达的结构蛋白之一,序列相对保守,是早期诊断检测病毒感染的理想靶点。

发明内容

[0005] 为了提高对新型冠状病毒N蛋白的特异性检测,本申请提供一种抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体对及其应用。

[0006] 第一方面,本申请提供的一种抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体对,采用如下的技术方案:

[0007] 一种抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体对,所述单克隆抗体对包括两个单克隆抗体;所述单克隆抗体包括重链可变区和轻链可变区;所述重链可变区包括重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;所述轻链可变区包括轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3。

[0008] 所述单克隆抗体对中的一个单克隆抗体命名为7E8C9抗体,序列信息如下:

[0009] 所述重链CDR1包括如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:1所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

[0010] 所述重链CDR2包括如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:2所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

[0011] 所述重链CDR3包括如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:3所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

[0012] 所述轻链CDR1包括如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:4所示序

列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

[0013] 所述轻链CDR2包括如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:5所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

[0014] 所述轻链CDR3包括如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:6所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

[0015] 所述单克隆抗体对中的另一个单克隆抗体命名为10H1C7抗体,序列信息如下:

[0016] 所述重链CDR1包括如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:7所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

[0017] 所述重链CDR2包括如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:8所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

[0018] 所述重链CDR3包括如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:9所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

[0019] 所述轻链CDR1包括如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:10所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

[0020] 所述轻链CDR2包括如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:11所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列;

[0021] 所述轻链CDR3包括如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:12所示序列相比具有1个或2个保守氨基酸替换的氨基酸序列,或者包含上述序列的氨基酸序列。

[0022] 所述7E8C9抗体中,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0023] 所述10H1C7抗体中,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0024] 第二方面,本申请提供一种核酸分子,采用如下技术方案:

[0025] 一种核酸分子,所述核酸分子编码上述单克隆抗体的氨基酸序列。

[0026] 所述核酸分子编码7E8C9抗体重链可变区的序列包括如SEQ ID NO:17所示的核苷酸序列,所述核酸分子编码单克隆抗体轻链可变区的序列包括如SEQ ID NO:18所示的核苷酸序列。

[0027] 所述核酸分子编码10H1C7抗体重链可变区的序列包括如SEQ ID NO:19所示的核苷酸序列,所述核酸分子编码单克隆抗体轻链可变区的序列包括如SEQ ID NO:20所示的核苷酸序列。

[0028] 第三方面,本申请提供一种抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株,采用如下技术方案:

[0029] 一种抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株,所述杂交瘤细胞株分泌上述单克隆抗体。

[0030] 第四方面,本申请提供一种检测新型冠状病毒的检测试剂盒,采用如下技术方案:

[0031] 一种检测新型冠状病毒的检测试剂盒,所述检测试剂盒包括上述抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体对。

[0032] 优选地,所述检测试剂盒中,所述7E8C9抗体作为捕获抗体,所述10H1C7抗体作为标记抗体。

[0033] 第五方面,本申请提供上述单克隆抗体对、上述核酸分子或上述检测新型冠状病毒的检测试剂盒在制备检测新型冠状病毒N蛋白抗原试剂中的应用。

[0034] 综上所述,本申请具有以下有益效果:

[0035] 本申请提供了一种抗新型冠状病毒N蛋白的单克隆抗体对,分别命名为7E8C9抗体和10H1C7抗体。其中,7E8C9抗体作为捕获抗体,10H1C7抗体作为标记抗体,对新型冠状病毒N蛋白具有良好的特异性和灵敏度。

附图说明

[0036] 图1为金标纸条的结构示意图。

[0037] 图2为本申请制备的胶体金层析纸条对不同稀释倍数下的奥密克戎毒株的检测情况。

[0038] 图3为本申请制备的胶体金层析纸条对不同稀释倍数下的德尔塔毒株的检测情况。

具体实施方式

[0039] 以下结合附图和实施例对本申请作进一步详细说明。

[0040] 实施例

[0041] 实施例1

[0042] 本实施例提供了杂交瘤细胞的制备方法以及阳性杂交瘤细胞的初步筛选过程,包括动物免疫、细胞免疫、阳性杂交瘤细胞的筛选以及阳性杂交瘤细胞的克隆化。经过筛选,本实施例共获得12株单抗杂交瘤细胞株。

[0043] 具体包括以下步骤:

[0044] 一、动物免疫

[0045] 免疫对象为8周龄BALB/C雌鼠。

[0046] 免疫所用的抗原为大肠杆菌重组表达的新型冠状病毒N蛋白,其包括如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列。

[0047] 免疫方式具体如下:

[0048] (1)免疫原的制备:

[0049] 将大肠杆菌重组表达的新型冠状病毒N蛋白与弗氏完全佐剂(Freund's Adjuvant, Complete, 货号为F5881, sigma公司)等体积混合,制得第一免疫原;

[0050] 将大肠杆菌重组表达的新型冠状病毒N蛋白与弗氏不完全佐剂(Freund's Adjuvant, Incomplete, 货号为F5506, sigma公司)等体积混合,制得第二免疫原;

[0051] 将大肠杆菌重组表达的新型冠状病毒N蛋白与生理盐水等体积混合,制得第三免疫原。

[0052] (2)免疫过程:

[0053] 第一次免疫:在BALB/C雌鼠背部皮下分3-4点注射50 μ g第一免疫原;

[0054] 两周后进行第二次免疫,在BALB/C雌鼠背部皮下分3-4点注射50 μ g第二免疫原;

[0055] 两周后进行第三次免疫,在BALB/C雌鼠背部皮下分3-4点注射50 μ g第二免疫原;

[0056] 两周后进行第四次免疫-冲击免疫,在BALB/C雌鼠腹腔注射50 μ g第三免疫原;

[0057] 24h后进行第五次免疫,在BALB/C雌鼠尾静脉注射50 μ g第三免疫原。

[0058] 二、细胞免疫

[0059] BALB/C雌鼠第五次免疫后的第三天开始细胞免疫。

[0060] 细胞免疫的过程具体包括以下步骤:

[0061] (1)脾细胞悬液的制备:在BALB/C雌鼠第五次免疫后的第三天,对BALB/c雌鼠摘除眼球采血,并分离BALB/c雌鼠血清作为抗体检测时的阳性对照;同时颈脱位致死BALB/c雌鼠,取其脾脏,制备脾细胞悬液;

[0062] 骨髓瘤细胞悬液的制备:提前两周(保证使用时骨髓瘤细胞处于对数生长期)复苏骨髓瘤细胞(ATCC,货号BNCC100908),制得骨髓瘤细胞悬液;

[0063] 饲养层细胞的制备:在进行细胞融合的前一天,取空白BALB/c雌鼠腹腔巨噬细胞和脾细胞,加入96孔板培养,得到含饲养层细胞的细胞板(细胞浓度为 1×10^4 /孔),制得饲养层细胞;

[0064] (2)细胞融合过程:

[0065] 采用PEG(聚乙二醇)介导细胞融合,取脾细胞悬液与骨髓瘤细胞悬液,按照细胞数量比为5:1的比例,在无血清的1640培养基(货号C3010-0500,VivaCell)中混匀,于1200rpm条件下离心5min,去掉上清;

[0066] 用手指轻弹离心管底部,使两种细胞松散混匀,置于装有37 $^{\circ}$ C水的烧杯中保温,在1min内加入1ml 50%PEG1500(pH 8.0,货号为10783641001,罗氏)融合细胞,边加边摇动,加完后静置30s;加入无血清的1640培养基(货号C3010-0500,VivaCell)终止融合,于800rpm条件下离心5min,沉淀用HAT培养基悬浮,分装到含饲养层细胞的细胞板中,获得含融合细胞-饲养层细胞的细胞板,并置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的细胞培养箱中培养;

[0067] 其中,配制500ml HAT培养基需要以下试剂:100ml胎牛血清FBS(货号为11011-8611,四季青),5ml细胞培养用青霉素-链霉素双抗(Penicillin-streptomycin,100 \times ,货号为E607011-0100,上海生工),10ml HAT培养基添加剂(HAT Media Supplement,50 \times ,货号为H0262,sigma公司),385ml 1640培养基(货号C3010-0500,VivaCell)。

[0068] 三、阳性杂交瘤细胞的筛选

[0069] 将上述含融合细胞-饲养层细胞的细胞板培养至第4天进行半换液,继续培养至第7天进行全换液,当融合细胞覆盖孔底10-50%时,利用常规间接ELISA方法筛选阳性孔。

[0070] 间接ELISA方法具体包括以下步骤:

[0071] (1)包板:利用大肠杆菌重组表达的新型冠状病毒N蛋白作为包被抗原,用pH值为9.6的0.05mol/L CB缓冲液(Na₂CO₃ 31.8g,NaHCO₃ 58.8g,超纯水补足至2L)稀释至2 μ g/ml,以100 μ L/孔加入酶标板,4 $^{\circ}$ C包被过夜后拍干,用质量体积比为1%的明胶-PBS缓冲液封闭,300 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C封闭过夜后拍干备用。

[0072] (2)检测:将含融合细胞-饲养层细胞的细胞板中的细胞培养上清液,以100 μ L/孔加入酶标板,放置37 $^{\circ}$ C孵育60min后,用含Tween-20的0.01mol/L PBST缓冲液洗涤并拍干,加入100 μ L/孔的HRP标记羊抗鼠二抗(货号为TJ-211229CN,厦门泰京),放置37 $^{\circ}$ C孵育60min后洗涤并拍干,加入100 μ L/孔的TMB显色液,放置37 $^{\circ}$ C避光显色10min,加入50 μ L/孔的1mol/L HCl终止反应。

[0073] 同时,以“二、细胞免疫”中眼球采血分离获得的BALB/c雌鼠血清作为阳性对照,筛

选出抗体效价较高的融合细胞,即为阳性杂交瘤细胞。

[0074] 四、阳性杂交瘤细胞的克隆化

[0075] 从含融合细胞-饲养层细胞的细胞板中筛选得到的阳性杂交瘤细胞,来源于两个以上的杂交瘤细胞,故筛选得到的杂交瘤细胞分泌的抗体是不同质的。为了获得完全同质的单克隆抗体,需要对阳性杂交瘤细胞进行克隆化。

[0076] 进行克隆化的前一天,按照“二、细胞免疫”中步骤(1)的方法制备饲养层细胞并铺板,得到含饲养层细胞的细胞板;利用HT培养基将筛选获得的阳性杂交瘤细胞悬浮并利用移液器吹打混匀,接种至含饲养层细胞的细胞板,并利用HT培养基将细胞板孔内细胞稀释至每个孔内1个细胞,置于37℃、5%CO₂湿润培养7-10天,出现肉眼可见的克隆细胞,即可检测抗体。

[0077] 其中,配制500ml HT培养基需要以下试剂:100ml胎牛血清FBS(货号为11011-8611,四季青),5ml细胞培养用青霉素-链霉素双抗(Penicillin-streptomycin,100×,货号为E607011-0100,上海生工),10ml HT培养基添加剂(HT Media Supplement,货号为H0137,sigma公司),385ml 1640培养基(货号C3010-0500,VivaCell)。

[0078] 在倒置显微镜下观察,标出只有单个克隆生长的孔,最终初步筛选获得了12株单抗杂交瘤细胞株,取上清进行下一步的功能筛选。对上述12株单抗杂交瘤细胞株进行命名,具体如表1所示。

[0079] 表1 12株单抗杂交瘤细胞株及抗体

细胞株 命名	单克隆抗体 命名	HRP-抗体偶联复合蛋白 命名	细胞株 命名	单克隆抗体抗体 命名	HRP-抗体偶联复合蛋白 命名
1A5G9 细胞株	1A5G9 抗体	HRP-1A5G9 抗体	4D4A7 细胞株	4D4A7 抗体	HRP-4D4A7 抗体
1C3B6 细胞株	1C3B6 抗体	HRP-1C3B6 抗体	5F8A1 细胞株	5F8A1 抗体	HRP-5F8A1 抗体
2B4F2 细胞株	2B4F2 抗体	HRP-2B4F2 抗体	7E8C9 细胞株	7E8C9 抗体	HRP-7E8C9 抗体
2E7E9 细胞株	2E7E9 抗体	HRP-2E7E9 抗体	8F4C6 细胞株	8F4C6 抗体	HRP-8F4C6 抗体
2H6C7 细胞株	2H6C7 抗体	HRP-2H6C7 抗体	10H1C7 细胞株	10H1C7 抗体	HRP-10H1C7 抗体
3D4H5 细胞株	3D4H5 抗体	HRP-3D4H5 抗体	9B5E6 细胞株	9B5E6 抗体	HRP-9B5E6 抗体

[0080] 实施例2

[0081] 本实施例提供了单克隆抗体的制备方法。具体包括利用杂交瘤细胞进行腹水的制备、单克隆抗体的纯化。

[0082] 本实施例分别利用实施例1筛选出的12株单抗杂交瘤细胞株制备单克隆抗体,最终制得12株特异性和灵敏性双优的单克隆抗体。具体如表1所示。

[0083] 上述制备方法具体包括以下步骤:

[0084] (1)腹水的制备

[0085] 向8-10周龄的Balb/c小鼠腹腔注射腹水专用佐剂(北京博奥龙,货号KX0210048),注射后第10d将表1所示的单抗杂交瘤细胞株(1×10^6 个细胞/只)注射到Balb/c小鼠腹腔,再过12d用医用注射器收集Balb/c小鼠腹水。

[0086] (2)单克隆抗体的纯化

[0087] 将步骤(1)收集好的Balb/c小鼠腹水倒入离心管中,12500rpm离心20min,收集上

清并依次用0.22 μ m滤膜过滤、Protein A柱(Protein ADiamond, 货号为AA301307, 博格隆生物)亲和层析纯化。

[0089] 利用Protein A柱亲和层析纯化的具体步骤如下:

[0090] 装柱:取5ml Protein A Resin介质加入层析柱静置,使用10个柱体积的超纯水冲洗层析柱;

[0091] 平衡:使用10个柱体积的预冷的Protein A柱平衡液(50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 溶剂为水, pH 8.0)平衡层析柱;

[0092] 上样:将0.22 μ m滤膜过滤后的样品上样,流速为5ml/min;

[0093] 洗涤:用10个柱体积的预冷的Protein A柱平衡液清洗层析柱;

[0094] 洗脱:用洗脱液(100mM Glycine, 150mM NaCl, 溶剂为水, pH 3.0)洗脱抗体,获得包含抗体的洗脱缓冲液;洗脱后立即将中和缓冲液(2M Tris-HCl, 溶剂为水, pH 9.0)加入洗脱缓冲液至溶液为中性pH;

[0095] 透析:洗脱得到的抗体在1000倍洗脱体积的PBS pH 7.4溶液中透析三次,获得纯化后的抗体,用紫外可见分光光度计(MV-5500PC, 上海元析仪器)测量抗体的浓度。

[0096] 实施例3

[0097] 本实施例提供了HRP-抗体偶联复合蛋白的制备方法。

[0098] 本实施例分别对实施例2制得的12株单克隆抗体进行HRP标记,最终制得12株HRP-抗体偶联复合蛋白。具体如表1所示。

[0099] 上述制备方法具体包括以下步骤:

[0100] 将纯化后的抗体用pH值为9.6的0.05mol/L CB缓冲液稀释至2mg/mL;佩戴PE手套操作,根据目标蛋白分子量大小截留实际需求及透析体积进行选取透析膜并裁剪适当长度;提前用pH值为9.6的0.05mol/LCB缓冲液浸泡处理透析膜,更换pH值为9.6的0.05mol/L CB缓冲液继续浸泡洗涤透析膜一次。将1mL抗体蛋白溶液转移至透析膜中。在pH值为9.6的0.05mol/L CB缓冲液中4 $^{\circ}$ C搅拌透析,每隔1h换液一次,共透析5次。

[0101] HRP的活化(醛基化):将HRP(辣根过氧化物酶, 货号为RS20220118, 瑞思试剂)溶于超纯水中配成浓度为20mg/mL的HRP溶液,将NaIO₄溶于超纯水配成浓度为20mg/mL NaIO₄溶液;涡旋充分溶解后,将HRP溶液和NaIO₄溶液按体积1:1混合,即NaIO₄溶液缓慢加入HRP溶液中,立即用锡纸包裹离心管,避光4 $^{\circ}$ C活化HRP 30min。

[0102] 终止HRP活化:将乙二醇缓缓滴加至HRP活化的离心管中并同时轻微震荡(每1mg HRP加入1 μ L乙二醇),继续4 $^{\circ}$ C避光30min。

[0103] 将终止活化的HRP溶液加入至抗体透析膜内(1mg抗体加入1mg HRP和1mg NaIO₄),于pH值为9.6的0.05mol/LCB缓冲液中,4 $^{\circ}$ C避光偶联过夜。

[0104] 第二天继续更换pH值为9.6的0.05mol/LCB缓冲液后,继续透析2h。透析后将偶联的透析液转移至离心管中,获得抗体-HRP偶联液。

[0105] 用纯水配制20mg/mL NaBH₄溶液加入到上面步骤中抗体-HRP偶联液中,加入量为每1mg HRP加入量为2 μ L NaBH₄溶液,4 $^{\circ}$ C反应2h,每0.5h上下颠倒混匀几下,获得偶联复合蛋白。

[0106] 用50%硫酸铵(即等体积饱和浓度的硫酸铵与获得的偶联复合蛋白液1:1混合)沉淀偶联复合蛋白,4 $^{\circ}$ C沉淀15min,10000rpm离心10min,获得的HRP-抗体偶联复合蛋白沉淀

在离心管一侧,小心用移液枪吸去上清。

[0107] 保存:将HRP-抗体偶联复合蛋白用保存液吹溶或涡旋溶解沉淀,-20℃保存。保存液为50%甘油、10%小牛血清、20mM PBS pH7.4。

[0108] 实施例4

[0109] 本实施例将实施例2制得的12株单克隆抗体和实施例3制得的12株HRP-抗体偶联复合蛋白进行两两配对,目的是筛选出能够识别新型冠状病毒N蛋白(包括如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列)不同表位的抗体。

[0110] 本实施例采用双抗夹心ELISA法,其中,单克隆抗体作为捕获抗体,HRP-抗体偶联复合蛋白作为标记抗体。具体包括以下步骤:

[0111] 将单克隆抗体(未进行HRP标记)作为捕获抗体,分别包被在酶标板上;然后向酶标板的孔中加入新型冠状病毒N蛋白,孵育后洗去未结合的新型冠状病毒N蛋白;再加入HRP-抗体偶联复合蛋白(进行了HRP标记)作为标记抗体,孵育后洗去未结合的HRP-抗体偶联复合蛋白;最后加入显色液显色,并利用分光光度计在280nm波长下测定结果,检测结果如表2所示。

[0112] 检测结果判断:如果可以显色,表明标记抗体与捕获抗体能够识别新型冠状病毒N蛋白的不同表位,说明该组捕获抗体与标记抗体为一对配对抗体。如果不能显色,表明标记抗体不能与新型冠状病毒N蛋白结合,从而被洗脱,说明该组捕获抗体与标记抗体不是配对抗体。

[0113] 表2 12株单克隆抗体和12株HRP-抗体偶联复合蛋白两两配对的检测结果

编号	捕获抗体	检测结果											
		标记抗体(HRP-抗体类型)											
		HRP-1A5G9	HRP-1C3B6	HRP-2B4F2	HRP-2E7E9	HRP-2H6C7	HRP-3D4H5	HRP-4D4A7	HRP-5F8A1	HRP-7E8C9	HRP-8F4C6	HRP-10H1C7	HRP-9B5E6
1	1A5G9 抗体	0.1412	0.1375	0.1585	0.1344	0.1187	0.0785	0.1114	0.1122	0.1400	0.9670	0.0861	0.0953
2	1C3B6 抗体	0.1473	0.1827	0.1522	0.1680	0.1156	0.1041	0.1084	0.0970	0.1288	0.1390	0.0920	0.1150
3	2B4F2 抗体	0.2313	0.2118	0.1727	0.1731	0.1287	0.1812	0.5314	0.1229	0.1191	0.1314	0.1183	0.1240
4	2E7E9 抗体	0.1888	0.1730	0.3147	0.1564	0.1693	0.1411	0.1375	0.1257	0.1295	0.1157	0.1364	0.1470
5	2H6C7 抗体	0.2457	0.1873	0.1615	0.1438	0.1415	0.1414	0.1493	0.1286	0.1637	0.1886	0.6178	0.9493
6	3D4H5 抗体	0.1987	0.1840	0.1891	0.1860	0.1688	0.1536	0.1635	0.1561	0.1555	0.1388	0.0990	0.1268
7	4D4A7 抗体	0.1995	0.2296	0.1821	0.1591	0.1523	1.1141	0.1775	0.1790	0.1830	0.1318	0.1394	0.1247
8	5F8A1 抗体	0.1707	0.1740	0.1167	0.1175	0.1992	0.1621	0.1510	0.1491	0.1847	0.1660	0.1510	0.2429
9	7E8C9 抗体	0.1519	0.3604	0.1485	0.1245	0.4778	0.9899	0.1440	0.7197	0.1325	0.1028	1.6200	0.1824
10	8F4C6 抗体	0.1704	0.1511	0.1223	0.1350	0.1574	0.1475	0.1640	0.1454	0.1543	0.1440	0.0143	0.1425
11	10H1C7 抗体	0.1540	0.1429	0.1253	0.1240	0.1343	0.1258	0.4021	0.6756	0.1090	0.1352	0.1275	0.1244
12	9B5E6 抗体	0.1437	0.1278	0.1144	0.1220	0.1342	0.1860	0.2041	0.1346	0.1518	0.1571	0.1253	0.1027

[0116] 由表2可知,通过上述试验,最终筛选出一对效价高的单克隆抗体,包括7E8C9抗体和10H1C7抗体。其中,7E8C9抗体为捕获抗体,10H1C7抗体为标记抗体。将产生7E8C9抗体的杂交瘤细胞命名为杂交瘤细胞7E8C9,将产生10H1C7抗体的杂交瘤细胞命名为杂交瘤细胞10H1C7。

[0117] 实施例5

[0118] 本实施例提供了杂交瘤细胞7E8C9和杂交瘤细胞10H1C7的细胞测序结果。

[0119] 分别扩大培养杂交瘤细胞7E8C9和杂交瘤细胞10H1C7,并收集 5×10^6 个细胞/ml于离心管中,吸干上清,冻存,干冰寄送至南京德泰生物工程有限公司进行杂交瘤细胞测序。

[0120] 测序结果如下:

[0121] (一)杂交瘤细胞7E8C9

[0122] (1)重链序列信息

[0123] 前导序列(碱基):包括如SEQ ID NO:18所示的核苷酸序列。

[0124] 前导序列(氨基酸):包括如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。

[0125] 重链全长碱基序列:包括如SEQ ID NO:16所示的核苷酸序列。

[0126] 重链全长氨基酸序列:包括如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。

[0127] 其中,重链可变区包括如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列。重链可变区包括重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3。重链CDR1包括如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。重链CDR2包括如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。重链CDR3包括如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。

[0128] 其中,重链恒定区包括如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0129] (2)轻链序列信息

[0130] 前导序列(碱基):包括如SEQ ID NO:24所示的核苷酸序列。

[0131] 前导序列(氨基酸):包括如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列。

[0132] 轻链全长碱基序列:包括如SEQ ID NO:22所示的核苷酸序列。

[0133] 轻链全长氨基酸序列:包括如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列。

[0134] 其中,轻链可变区包括如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列。轻链可变区包括轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3。轻链CDR1包括如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。轻链CDR2包括如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。轻链CDR3包括如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

[0135] 其中,轻链恒定区包括如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。

[0136] (二)杂交瘤细胞10H1C7

[0137] (1)重链序列信息

[0138] 前导序列(碱基):包括如SEQ ID NO:30所示的核苷酸序列。

[0139] 前导序列(氨基酸):包括如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列。

[0140] 重链全长碱基序列:包括如SEQ ID NO:28所示的核苷酸序列。

[0141] 重链全长氨基酸序列:包括如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列。

[0142] 其中,重链可变区包括如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列。重链可变区包括重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3。重链CDR1包括如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。重链CDR2包括如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。重链CDR3包括如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。

[0143] 其中,重链恒定区包括如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列。

[0144] (2)轻链序列信息

[0145] 前导序列(碱基):包括如SEQ ID NO:36所示的核苷酸序列。

[0146] 前导序列(氨基酸):包括如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列。

[0147] 轻链全长碱基序列:包括如SEQ ID NO:34所示的核苷酸序列。

[0148] 轻链全长氨基酸序列:包括如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列。

[0149] 其中,轻链可变区包括如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列。轻链可变区包括轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3。轻链CDR1包括如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。轻链CDR2包

括如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。轻链CDR3包括如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

[0150] 其中,轻链恒定区包括如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列。

[0151] 实施例6

[0152] 本实施例提供了一种利用7E8C9抗体和10H1C7抗体制备的胶体金层析纸条。

[0153] 上述胶体金层析纸条的制备方法,具体包括以下步骤:

[0154] 一、检测垫的制备

[0155] (1) 包被缓冲液的配制:称取2.901g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2914g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、8.5g NaCl、25g蔗糖,溶于1000ml超纯水中,pH 7.4,置于4℃下保存备用。

[0156] (2) 检测线制备:取1mg/ml的7E8C9抗体,在硝酸纤维膜上制备检测线,喷涂量为1.5 $\mu\text{l}/\text{cm}$,喷涂长度为30cm。宽度为1mm。

[0157] (3) 质控线制备:取1mg/ml的羊抗鼠IgG多克隆抗体(杭州隆基生物技术有限公司),在硝酸纤维膜上制备质控线,喷涂量为1.5 $\mu\text{l}/\text{cm}$,喷涂长度为30cm。质控线和检测线的距离为5mm。

[0158] (4) 将包被好检测线和质控线的硝酸纤维膜即为检测垫,将检测垫贴在PVC衬板上,置于50℃的烘箱中干燥24 \pm 2h。

[0159] 二、金标结合物的标记过程

[0160] (1) 相关溶液的配制:

[0161] 0.2M K_2CO_3 溶液的配制:称取2.7642g无水碳酸钾溶于100ml纯水中。

[0162] 20% BSA溶液的配制:称取20g BSA(牛血清白蛋白,货号为V900933,Sigma)、100 μl proclin300溶于100ml超纯水中,置于4℃下保存备用。

[0163] 复溶液的配制:称取0.36g Tris、0.3g酪蛋白钠、0.2g PEG20000、100 μl TW-20(吐温-20)、2g蔗糖、100 μl proclin300溶于100ml超纯水中,pH 8.0,置于4℃下保存备用。

[0164] (2) 标记过程

[0165] 1) 取100ml 0.01%胶体金溶液(货号为C805628,麦克林)置于干净的容器中,加入100 μl -300 μl 的0.2M K_2CO_3 溶液搅拌均匀;

[0166] 2) 加入150 μg -500 μg 的10H1C7抗体,搅拌反应1-2h;

[0167] 3) 加入500 μl 的20% BSA溶液进行搅拌,封闭30min;

[0168] 4) 离心:10000r/min离心15min后,弃上清;

[0169] 5) 复溶:离心后的沉淀用复溶液40倍浓缩复溶,获得标记好的检测标记结合物,置于4℃下保存备用。

[0170] 三、结合垫的制备

[0171] (1) 金标结合物溶液的配制:0.362g Tris、0.2g酪蛋白钠、0.2g PEG20000、100 μl TW-20、3g蔗糖、2g海藻糖、100 μl proclin300溶于100ml超纯水中,pH8.0,置于4℃下保存备用。

[0172] (2) 将标记好的检测标记结合物按7-15%浓度,加入金标结合物溶液中,混合均匀,并均匀涂布在玻璃纤维膜(35ml/张),置于50℃的烘箱中干燥24 \pm 2h。

[0173] 四、样本垫的制备

[0174] (1) 样本垫处理液的配制:0.242g Tris、0.5g酪蛋白钠、0.1g Pvp-40、500 μl TW-20、100 μl proclin300溶于100ml超纯水中,pH8.0,置于4℃下保存备用。

[0175] (2)按每板32ml样本垫处理液,均匀涂布在玻璃纤维膜,置于50℃的烘箱中干燥24±2h,检测鉴定合格后,置于室温密封保存备用。

[0176] 五、吸水纸的裁切

[0177] 用裁纸机将吸水纸切成25-35cm长、 1.7 ± 0.05 cm宽的纸片,置于干燥房间(干燥房:白天温度控制在30-35℃;晚上控制在35-40℃;湿度在10-30%)备用。

[0178] 六、金标纸条的组装(车间温度控制在18~28℃,湿度10-30%)

[0179] 图1为金标纸条的结构示意图。

[0180] 按照图1所示的结构,依次将样本垫、结合垫粘贴在PVC板靠近检测线的一端,且样本垫部分搭接在结合垫上,结合垫部分搭接在检测垫上;将吸水纸粘贴在PVC板远离检测线的一端,且吸水纸部分搭接在检测垫上。组成大板后,按照宽度3mm裁剪成细条。

[0181] 实施例7

[0182] 本实施例利用实施例6制备的胶体金层析纸条进行病毒检测,检测胶体金层析纸条的灵敏度。检测对象为灭活的奥密克戎毒株病毒培养液(北京卡梅德生物科技有限公司)和灭活的德尔塔毒株病毒培养液(南京佰抗生物科技有限公司)。

[0183] (1)奥密克戎毒株灵敏性试验

[0184] 灭活的奥密克戎毒株病毒培养液的滴度为 1.4×10^5 TCID₅₀/mL,利用稀释液(成分:10mM PBS,2% BSA,0.1%吐温20)依次按照1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:10000稀释后,利用实施例6制备的胶体金层析纸条检测结果。

[0185] 检测方法为:将100μL稀释后的溶液滴加在样本垫上,5-10min后,观察检测垫上检测线和质控线的显色情况。上述不同稀释倍数下的显色结果如图2所示。

[0186] 图2为本申请制备的胶体金层析纸条对不同稀释倍数下的奥密克戎毒株的检测情况。

[0187] 由图2可知,在奥密克戎毒株1:4000稀释后还能明显观察到检测条带,在奥密克戎毒株毒株1:10000稀释后还能观察到微弱的检测条带。说明该胶体金试纸条的最低检测奥密克戎毒株的滴度为 $14\times$ TCID₅₀/mL。

[0188] (2)德尔塔毒株灵敏性试验

[0189] 灭活的德尔塔毒株病毒培养液的滴度为 1.0×10^6 TCID₅₀/mL,利用稀释液(成分:10mM PBS,2% BSA,0.1%吐温20)依次按照1:5000、1:10000、1:20000、1:40000、1:100000稀释后,利用实施例6制备的胶体金层析纸条检测结果。

[0190] 检测方法为:将100μL稀释后的溶液滴加在样本垫上,5-10min后,观察检测垫上检测线和质控线的显色情况。上述不同稀释倍数下的显色结果如图3所示。

[0191] 图3为本申请制备的胶体金层析纸条对不同稀释倍数下的德尔塔毒株的检测情况。

[0192] 由图3可知,在德尔塔毒株1:40000稀释后还能明显观察到检测条带,在奥密克戎毒株毒株1:100000稀释后还能观察到微弱的检测条带。说明该胶体金试纸条的最低检测德尔塔毒株的滴度为 $10\times$ TCID₅₀/mL。

[0193] 实施例8

[0194] 本实施例利用实施例6制备的胶体金层析纸条进行病毒检测,检测胶体金层析纸条的特异性。检测对象为常见的灭活病毒培养液。检测结果如表3所示。

[0195] 表3本申请的胶体金层析纸条的特异性检测结果

名称	浓度	结果	名称	浓度	结果
Influenza B/Yamagata	1.83×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Measles virus	6.31×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性
Influenza B/Victoria	2.07×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Mumps virus	6.31×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性
Influenza A H1N1	1.00×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Respiratory syncytial virus	2.00×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性
Influenza A H3N2	1.15×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Rhinovirus 1A	1.26×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性
Influenza A H5N1	1.32×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Norovirus	1.30×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性
H7N9 Avian Influenza	1.60×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Epstein Barr Virus	2.18×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性
SARS Coronavirus	2.14×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Varicella zoster virus	1.00×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性
Adenovirus 1	1.39×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Bacillus pertussis	1.30×10^6 CFU/mL	阴性
Adenovirus 3	1.24×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Chlamydomphila pneumoniae	1.00×10^6 CFU/mL	阴性
Adenovirus 7	1.87×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Escherichia coli	1.00×10^6 CFU/mL	阴性
Human coronavirus 229E	2.00×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Haemophilus influenzae	1.20×10^6 CFU/mL	阴性
Human coronavirus OC43	2.34×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Mycobacterium binding	1.00×10^6 CFU/mL	阴性
Human coronavirus NL63	2.00×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Mycoplasma Pneumoniae	1.00×10^6 CFU/mL	阴性
Human coronavirus HKU1	2.00×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Candida Albicans	1.00×10^6 CFU/mL	阴性
MERS-coronavirus	1.00×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Neisseria meningococcus	1.00×10^6 CFU/mL	阴性
Cytomegalovirus	1.00×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Neisseria gonorrhoeae	1.00×10^6 CFU/mL	阴性
Enterovirus 71	2.55×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Pseudomonas aeruginosa	3.70×10^6 CFU/mL	阴性
Human parainfluenza virus 1	1.35×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Staphylococcus aureus	2.20×10^6 CFU/mL	阴性

[0196]

Human parainfluenza virus 2	6.31×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Streptococcus pneumoniae	1.00×10^6 CFU/mL	阴性
Human parainfluenza virus 3	3.25×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Streptococcus pyogenes	1.28×10^6 CFU/mL	阴性
Human parainfluenza virus 4	3.31×10^6 TCID ₅₀ /mL	阴性	Streptococcus salivarius	1.00×10^6 CFU/mL	阴性
			Legionella Pneumophila	1.58×10^6 CFU/mL	阴性

[0197]

[0198] 由表3的检测结果表明,本申请提供的胶体金层析纸条对表3中常见病毒的检测结果均为阴性,结合实施例7的检测结果表明,说明该胶体金层析纸条对新型冠状病毒N蛋白具有较好的特异性。

[0199] 本具体实施例仅仅是对本申请的解释,其并不是对本申请的限制,本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改,但只要在本申请的权利要求范围内都受到专利法的保护。

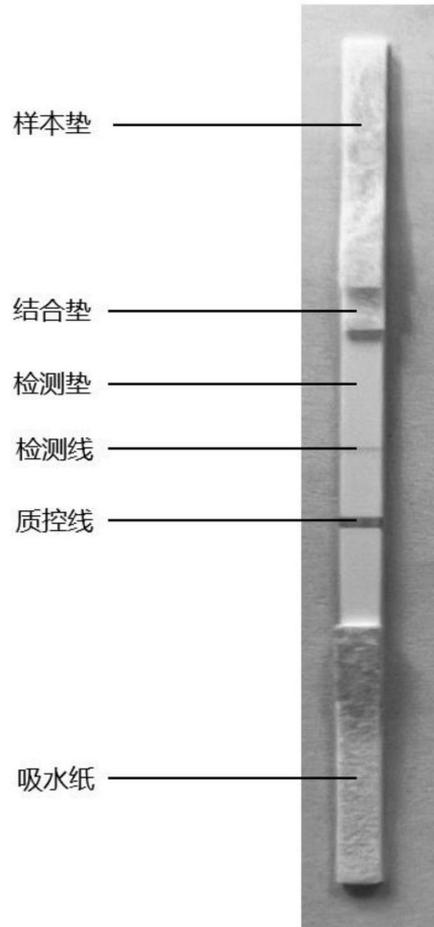


图1

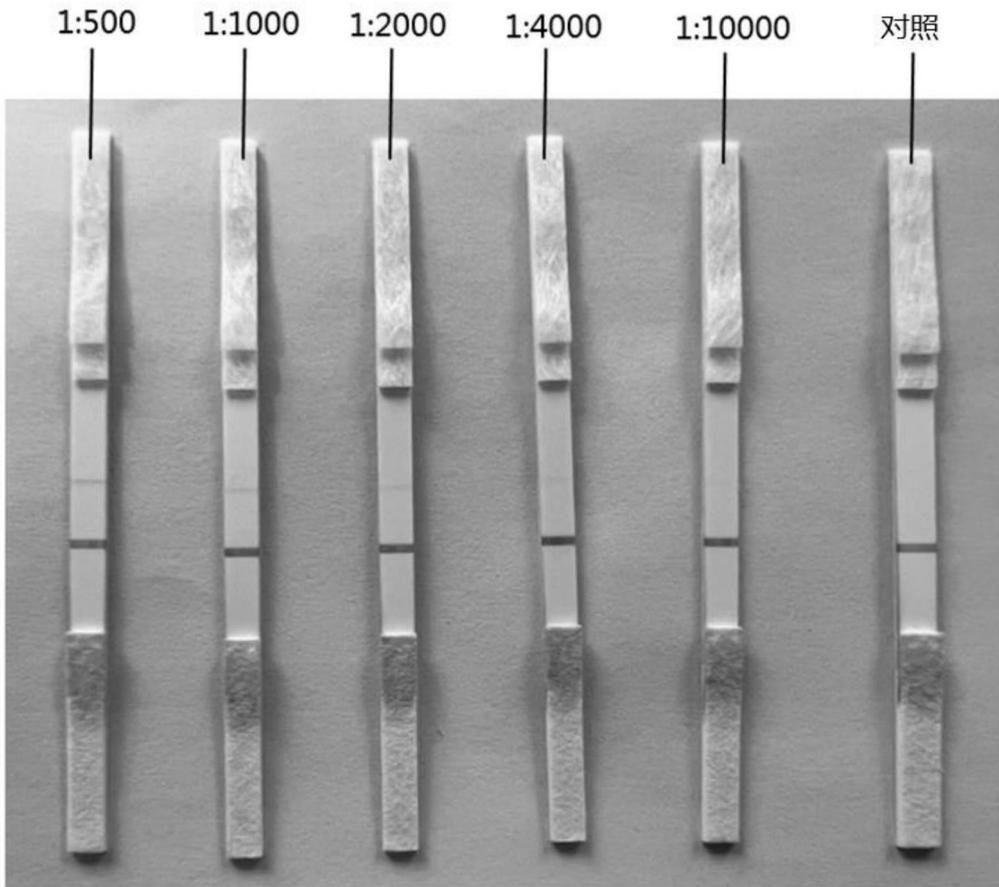


图2

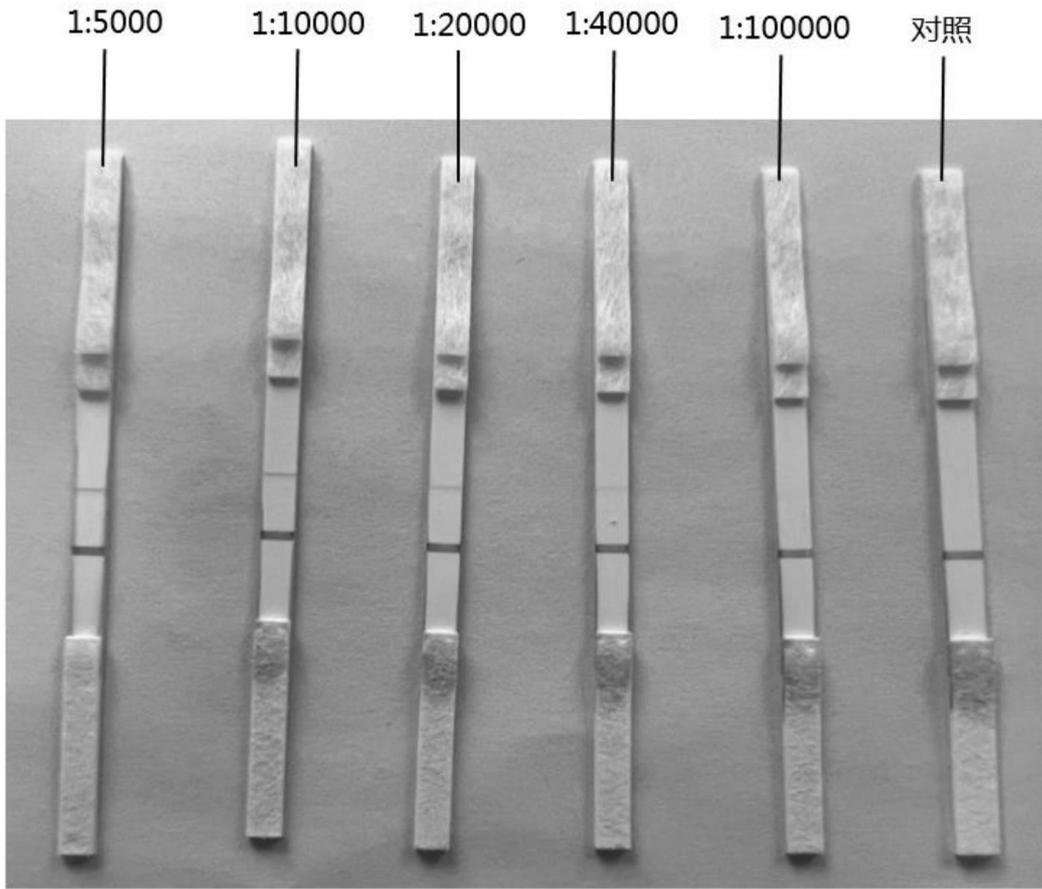


图3