



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115850402 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 28

(21) 申请号 202211485356.X

(22) 申请日 2022.11.24

(71) 申请人 山西锦波生物医药股份有限公司
地址 030032 山西省山西综改示范区太原
唐槐园区锦波街18号

(72) 发明人 于玉凤

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
专利代理师 张文辉

(51) Int. Cl.

C07K 14/18 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

G12N 15/13 (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5页

(54) 发明名称

一种寨卡病毒非结构蛋白NS2A多肽及其抗体的制备

(57) 摘要

提供了一种寨卡病毒非结构蛋白NS2A多肽及其抗体的制备。提供了多肽,其包含以SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或其变体,该变体与以SEQ IDNO.1所示的氨基酸序列具有90%的序列同一性。本发明首次提供了一种ZIKV NS2A多肽及多肽抗体,该多肽与KLH偶联后制备了ZIKV NS2A抗体,该抗体可用于蛋白质印迹及免疫荧光实验及其他抗原抗体识别实验中。

1. 多肽,其包含以SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或其变体,该变体与以SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列具有90%的序列同一性。
2. 缀合物,其包含载体蛋白和根据权利要求1所述的多肽,优选地,所述载体蛋白是KLH蛋白。
3. 多克隆抗体,该多克隆抗体通过用权利要求2的缀合物免疫动物后纯化获得。
4. 核酸,其包含编码根据权利要求1所述的多肽的核苷酸序列,任选地,核酸还包含编码纯化标签,例如His标签、GST标签、MBP标签、SUMO标签或NusA标签的核苷酸序列;任选地,核酸还包含编码前导序列的核苷酸序列。
5. 载体,其包含根据权利要求4所述的核酸,任选地包含与所述核酸可操作连接的表达控制元件,如启动子、终止子和/或增强子。
6. 宿主细胞,其包含根据权利要求4所述的核酸或根据权利要求5所述的载体;其中优选地,宿主细胞是真核细胞或原核细胞;其中优选地,真核细胞是酵母细胞、动物细胞和/或昆虫细胞,和/或原核细胞是大肠杆菌细胞。
7. 组合物,其包含根据权利要求1所述的多肽和/或根据权利要求5所述的缀合物和药学可接受的载体,优选地佐剂,优选地组合物还包含从寨卡病毒NS2A蛋白衍生的另一种肽。
8. 制备多克隆抗体的方法,其包括用根据权利要求1所述的多肽、根据权利要求2所述的缀合物、或根据权利要求7所述的组合物免疫哺乳动物,从该哺乳动物收集血液,并且从血液收集多克隆抗体;优选地,哺乳动物是兔。
9. 制备根据权利要求1所述的多肽的方法,其包括培养权利要求6所述的宿主细胞,并且收集所述多肽。
10. 根据权利要求3所述的多克隆抗体在制备用于治疗 and/或诊断受试者中的寨卡病毒感染或用于检测寨卡病毒的NS2A蛋白的试剂盒中的用途。
11. 体外或离体检测寨卡病毒的方法,其包括使根据权利要求3所述的多克隆抗体与疑似包含寨卡病毒的物体,例如细胞接触的步骤。
12. 检测寨卡病毒的NS2A蛋白的非治疗或诊断目的的方法,其包括使用权利要求3的多克隆抗体,通过蛋白质印迹或免疫荧光检测方法检测受寨卡病毒感染的细胞中的NS2A蛋白。

一种寨卡病毒非结构蛋白NS2A多肽及其抗体的制备

技术领域

[0001] 本发明涉及多克隆抗体,具体涉及寨卡病毒非结构蛋白NS2A多肽及其抗体的制备。

背景技术

[0002] 寨卡病毒(Zika virus,ZIKV)是一种以蚊媒传播为主的、有包膜、单股正链的RNA病毒,与登革病毒(Dengue virus,DENV)、西尼罗病毒(West Nile virus,WNV)、日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus,JEV)等同属于黄病毒科黄病毒属。截止到2019年7月份,全球约87个国家或部落报道了ZIKV的蚊媒传播感染。寨卡病毒感染孕妇,导致婴儿小头症或神经细胞发育异常,感染成年人会导致吉兰-巴雷综合症、神经炎或脑膜炎等神经系统损伤疾病。现有研究表明ZIKV感染可直接或间接导致神经发生、发育及成熟障碍。

[0003] ZIKV基因组有一个开放阅读框,其编码区的长度约为10.8kb,依次编码3种结构蛋白:衣壳蛋白(capsid protein,C)、膜蛋白及其前体(membrane protein and its precursor membrane,M/prM)和包膜蛋白(envelope protein,E蛋白)和7种非结构蛋白(nonstructural protein),即NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5。其中,NS2A参与ZIKV复制、组装及出芽并帮助病毒逃逸宿主免疫,还通过降解连接蛋白和钙粘附蛋白而破坏大脑皮层中的神经发生,进而导致小头症。NS2A含226个氨基酸,包括7个跨膜区(transmembrane segments,pTMS),N端区域(pTMS1-pTMS2)靠近ER腔,pTMS3横跨ER膜,C端区域(pTMS4-pTMS7)靠近胞质。NS2A的多重跨膜结构导致目前没有NS2A蛋白的商业化抗体上市,进而使得对NS2A开展的科学研究也相对较为缺乏。

[0004] 本领域中需要能够引发抗NS2A抗体的免疫原性片段以及抗NS2A抗体。

发明内容

[0005] 目前未有上市可以购买的ZIKV NS2A抗体。NS2A抗体多重跨膜结构导致其蛋白体外表达较难,而多肽可通过合成获得。本发明通过抗原软件预测NS2A蛋白的抗原区域,通过大量筛选工作获得多肽。随后,合成该多肽,偶联KLH,免疫新西兰大白兔,获得免疫血清后,通过抗体纯化,最终获得NS2A抗体。经检测该NS2A抗体能够检测ZIKV NS2A蛋白。

[0006] 在一方面,本发明提供了多肽,其包含以SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或其变体,该变体与以SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列具有90%的序列同一性。

[0007] 在一方面,本发明提供了缀合物,其包含载体蛋白和本文所述的多肽。在一个实施方案中,载体蛋白是KLH蛋白。

[0008] 在一方面,本发明提供了多克隆抗体,该多克隆抗体针对寨卡病毒NS2A蛋白。在一个实施方案中,本发明的多克隆抗体可以通过用本文所述的缀合物免疫动物后纯化获得。

[0009] 在一方面,本发明提供了核酸。在一个实施方案中,本发明的核酸可以包含编码本文所述的多肽的核苷酸序列。

[0010] 在一个实施方案中,核酸还包含编码纯化标签,例如His标签、GST标签、MBP标签、

SUMO标签或NusA标签的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸还包含编码前导序列的核苷酸序列。

[0011] 在一方面,本发明提供了载体,其包含本文所述的核酸。在一个实施方案中,载体包含与核酸可操作连接的表达控制元件,如启动子、终止子和/或增强子。

[0012] 在一方面,本发明提供了宿主细胞,其包含本文所述的核酸或本文所述的载体。在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞或原核细胞。在一个实施方案中,真核细胞是酵母细胞、动物细胞和/或昆虫细胞。在一个实施方案中,原核细胞是大肠杆菌细胞。

[0013] 在一方面,本发明提供了组合物。本发明的组合物可以包含本文所述的多肽。在一个实施方案中,本发明的组合物可以包含本文所述的缀合物。在一个实施方案中,本发明的组合物还可以包含药学可接受的载体。在一个实施方案中,药学可接受的载体是佐剂。在一个实施方案中,组合物还包含从寨卡病毒NS2A蛋白衍生的另一种肽。

[0014] 在一方面,本发明提供了制备多克隆抗体的方法,其包括用本文所述的多肽、本文所述的缀合物、或本文所述的包含多肽或缀合物的组合物免疫哺乳动物,从该哺乳动物收集血液,并且从血液收集多克隆抗体。在一个实施方案中,哺乳动物是兔。

[0015] 在一方面,本发明提供了制备本文所述的多肽的方法,其包括培养本文所述的宿主细胞,并且收集所述多肽。

[0016] 在一方面,本发明提供了本文所述的多克隆抗体在制备用于治疗和/或诊断受试者中的寨卡病毒感染或者用于检测寨卡病毒的NS2A蛋白的试剂盒中的用途。

[0017] 在另一个方面,本发明提供了体外或离体检测寨卡病毒的方法,其包括使本文所述的多克隆抗体与疑似包含寨卡病毒的物体接触的步骤。物体可以是细胞或者是包含细胞的物质。

[0018] 在另一个方面,本发明提供了检测NS2A蛋白的方法,其包括使用本文所述的多克隆抗体,通过蛋白质印迹或免疫荧光检测方法检测受寨卡病毒感染的细胞中的NS2A蛋白。

[0019] 本发明的优点包括:

[0020] 1. 本发明首次提供了一种ZIKV NS2A多肽及多肽抗体,其氨基酸序列为GSTDHMDHFSLVLC,该多肽与KLH偶联后制备了ZIKV NS2A抗体。

[0021] 2. 本发明提供了一种可用于制备ZIKV NS2A抗体的多肽序列,包括其偶联了增强抗原蛋白KLH,包括其该抗体用于WB及IF实验,及其他类似的抗原抗体识别实验中。

[0022] 3. 相比于源自天然NS2A蛋白的其他肽,本发明的多肽可以在蛋白质印迹和免疫荧光检测法中检测受寨卡病毒感染的细胞中的NS2A蛋白。

[0023] 4. 本发明的多肽的长度仅为14个氨基酸,容易合成,并且可以在兔中产生高滴度的抗NS2A抗体。

[0024] 5. 与目前现有的检测寨卡病毒感染的商业抗体,本发明的多克隆抗体可以更好地检测寨卡病毒感染(在更早期的感染时间点和更高的灵敏性)。

附图说明

[0025] 图1:纯化抗体多肽4抗体的Western印迹检测。随时间变化不同抗体的检测结果。

[0026] 图2:纯化抗体多肽1抗体的Western印迹检测。左侧图为多肽1抗体,以0.65 μ g/ml浓度使用;右侧图为多肽1抗体,以1 μ g/ml浓度使用。

[0027] 图3:纯化抗体多肽4抗体的ELISA检测。

[0028] 图4:纯化抗体多肽4抗体的免疫荧光(IF)检测。前两行为多肽4抗体检测的结果;中间两行为E抗体检测的结果;最后两行为NS1抗体检测的结果。E抗体为由4G2杂交瘤细胞制备的鼠单克隆抗体(由中山大学的江丽芳教授赠送的杂交瘤4G2产生)。

[0029] 图5:对图4的实验结果进行统计分析,以图4的照片中随机选择3个视野进行统计分析,使用统计软件为SPSS13.0,统计方法为双尾T-检验,*, $P < 0.5$;**, $P < 0.001$ 。

[0030] 图6:多肽4抗体特异性识别寨卡病毒的NS2A。A)多肽4抗体对不同病毒的免疫荧光(IF)检测。B)多肽4抗体对不同病毒的WB检测。C)不同病毒株的多肽序列比对。

具体实施方式

[0031] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明的实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0032] 如本文中所用,“多肽”是指ZIKV NS2A衍生的具有免疫原性或抗原性的多肽。多肽的长度可以是10-15个氨基酸残基,例如11、12、13和14个氨基酸残基。在本文中,多肽包含以SEQ ID NO.1 (GSTDHMDHFSLGVLC)所示的氨基酸序列或其变体,该变体与以SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列具有90%的序列同一性,例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的序列同一性。

[0033] 如本文中所用,“载体蛋白”是指任何在免疫学上可接收的用于形成完全抗原的蛋白质。载体蛋白包括但不限于牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白(KLH)、人血清白蛋白(HSA)及人工合成的多聚赖氨酸(PLL)等。在本文中,载体蛋白可以是钥孔血蓝蛋白(KLH)。载体蛋白可以交联于半抗原和其他抗原,例如多肽,以增强它们的免疫原性。

[0034] 如本文中所用,“缀合物”是指将多肽与载体蛋白缀合形成的物质,其能够在机体中产生抗体免疫应答。产生缀合物的方式是本领域中公知的。例如,可以使用化学试剂,诸如碘乙酰胺(Iodoacetamide)、马来酰亚胺(Maleimide)、或烷基卤(Alkyl halide)将载体蛋白与抗原肽缀合。这可以通过载体蛋白上的氨基和抗原肽上的硫氢基进行。

[0035] 如本文中所用,“佐剂”是指能够增强免疫应答或改变免疫应答类型的物质,应用时可与抗原同时或预先注射与机体。佐剂本身可以有免疫原性,也可以没有免疫原性。佐剂可以包括无机佐剂(如氢氧化铝、明矾等);生物性佐剂(如结核分枝杆菌、卡介苗、小棒状杆菌、百日咳杆菌、革兰阴性杆菌内毒素、霍乱毒素B亚单位、胞壁酰二肽和细胞因子等);人工合成佐剂(如双链多聚肌苷酸:胞苷酸(Poly I:C)、双链多聚腺苷酸:尿苷酸);弗氏完全佐剂、花生油乳剂;纳米佐剂等。

[0036] 如本文中所用,“变体”是指与参考多肽相比具有1个或多个氨基酸残基的突变(诸如添加、缺失、取代、插入)的多肽。例如,与以SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列相比,变体可以具有1个或多个氨基酸残基的突变(诸如添加、缺失、取代、插入)。优选地,突变是保守的氨基酸取代。

[0037] 如本文中所用,“核酸”是指通过核苷酸间连接的多个核苷酸。核苷酸间连接可以是例如磷酸二酯键。本文中的核酸可以包含编码本发明的多肽的多核苷酸。

[0038] 如本文中所示，“多克隆抗体”是对特定抗原所产生的一组免疫球蛋白混合物，每种免疫球蛋白能识别抗原分子上的一个表位。在本文中，多克隆抗体是通过用本文所述的缀合物免疫兔产生的。本文中的多克隆抗体可以用于检测ZIKV NS2A或者体外或离体检测寨卡病毒。

[0039] 为了便于多肽后续处理，本发明的核酸还可以包含编码纯化标签，例如His标签、GST标签、MBP标签、SUMO标签或NusA标签的核苷酸，以及当需要时编码前导序列的核苷酸。

[0040] 如本文中所示，术语“载体”是可将多核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白质获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化、转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如λ噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体可以包含本发明的核酸以便于导入细胞进行表达。载体可以包含与所述核酸可操作连接的表达控制元件，如启动子、终止子和/或增强子。

[0041] 如本文中所示，术语“宿主细胞”是已经通过分子生物学技术将核酸分子引入的细胞。这些技术包括转染病毒载体，用质粒载体转化，以及通过电穿孔、脂转染、和粒子枪加速引入裸DNA。宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞。例如，真核细胞是酵母细胞、动物细胞和/或昆虫细胞。原核细胞可以是大肠杆菌细胞。

[0042] 多肽、载体蛋白和缀合物

[0043] 本发明提供了多肽、载体蛋白和缀合物。多肽可以是SEQ ID NO.1 (GSTDHMDHFSGLVLC)所示的氨基酸序列或其变体。多肽可以用作免疫原性多肽或抗原多肽以免疫动物产生多克隆抗体。在本文中，可以使用载体蛋白与多肽缀合后得到缀合物免疫动物以增加多克隆抗体的产生。缀合的方式是本领域中已知的。例如，可以使用化学试剂，诸如碘乙酰胺(Iodoacetamide)、马来酰亚胺(Maleimide)、或烷基卤(Alkyl halide)将载体蛋白与抗原肽缀合。这可以通过载体蛋白上的氨基和抗原肽上的巯基进行。使用多肽或缀合物免疫动物以获得多克隆抗体的方法是本领域中已知的。动物可以是哺乳动物，例如兔、小鼠、豚鼠等。

[0044] 试剂盒

[0045] 本发明的各种材料，包括多肽、载体蛋白、缀合物、抗体(例如多克隆抗体)、佐剂等都可以制备成试剂盒。试剂盒也包含本文所述的各种材料(例如多肽、载体蛋白、缀合物、抗体)中的任一种或多种。试剂盒可以用于各种的目的，例如用于治疗和/或诊断受试者中的寨卡病毒感染，体外或离体检测寨卡病毒或检测寨卡病毒的NS2A蛋白。

[0046] 应用

[0047] 本发明的各种材料，包括多肽、载体蛋白、缀合物、抗体(例如多克隆抗体)可以在多个方面得到应用。例如，本发明的多克隆抗体可以用于治疗和/或诊断受试者中的寨卡病毒感染或者用于检测寨卡病毒的NS2A蛋白的方法。方法可以包括使用多克隆抗体检测NS2A蛋白的步骤。例如，可以通过蛋白质印迹或免疫荧光检测方法检测受寨卡病毒感染的细胞中的NS2A蛋白的存在。本发明的多克隆抗体也可以用于体外或离体检测寨卡病毒的方法，

其包括使多克隆抗体与疑似包含寨卡病毒的物体,例如细胞接触的步骤。

[0048] 实施例

[0049] 提供以下实施例来阐述本发明。本领域技术人员应当理解实施例仅仅是例示性的,而非限制性的。本发明仅仅由所附权利要求书的范围限定。

[0050] 实施例1:抗原性区域筛选

[0051] 为了筛选获得NS2A的抗原性区域,首选使用GenScript OptimumAntigen™设计软件对NS2A的抗原性、亲疏水性、跨膜区、同源性、螺旋区、信号肽等进行了预测分析。预测分析结果见表1。表1根据多肽抗原性预测数值的高低排序了胞外的多肽1-多肽8,其中多肽1的抗原性最高。

[0052] 表1:NS2A抗原多肽筛选结果

肽编号	多肽	长度	抗原性 /表面/亲水性	无序得分	合成	Mus_musculus Rattus_norvegicus Oryctolagus_cunicul us blast	
[0053]	1	CLSLKKGKGSVKKNLP	14	1.44/0.64/0.30	NONE	容易	42% 56% 56%
	2	GATFAEMNTGGDVAC	14	0.88/0.71/-0.22	NONE	容易	42% 56% 42%
	3	CIRAMVVPRTDNITL	14	0.84/0.43/-0.21	NONE	正常	42% 49% 42%
	4	GSTDHMDHFSLGVLC	14	0.83/0.64/-0.25	0.2043	容易	42% 42% 49%
	5	CNVVGLLLLTRSGKR	14	0.79/0.43/-0.11	0.1850	容易	64% 64% 57%
	6	EGLKKRMTTKIIISC	14	0.75/0.71/0.34	NONE	容易	50% 49% 42%
	7	CSFIFRANWTPRESM	14	0.71/0.64/-0.32	NONE	容易	50% 70% 42%
	8	CQTAISALEGLMVL	14	0.38/0.57/-0.40	NONE	困难	56% 56% 64%

[0054] 实施例2:多肽抗体的制备

[0055] 发明人选择多肽1-多肽8,并且委托金斯瑞生物科技有限公司进行多肽的合成和抗体的制备。具体地,委托金斯瑞生物科技有限公司商业合成多肽1-多肽8,并偶联KLH蛋白。将偶联KLH的多肽与金斯瑞生物科技有限公司的自有佐剂混匀,背部多点免疫新西兰大白兔,免疫多次。在终免后收集兔子的抗血清,约获得抗血清40ml/只。使用抗原亲和纯化抗体,通过检测OD₂₈₀检测抗体浓度并且产生多肽1-8各自制备的抗体(上述步骤委托金斯瑞完成,使用金斯瑞生物科技有限公司内部免疫流程)。

[0056] 实施例3:多肽抗体的WB检测

[0057] 在本实施例中,多肽1和多肽4各自制备的抗体的纯品(多肽1抗体和多肽4抗体)由金斯瑞生物科技有限公司。发明人使用多肽1抗体和多肽4抗体分别进行了Western Blot (WB) 免疫印迹。发现了多肽4抗体在Western Blot (WB) 免疫印迹中具备更佳的检测效果。

[0058] 1.Western Blot (WB) 免疫印迹,是将蛋白质变性后转移到膜上,然后利用抗体进行检测的方法,常用于检测目标蛋白的表达水平;在本实施例中用此方法检测用多肽4制备的兔抗体对目标蛋白NS2A线性表位的识别能力。具体原理如下:首先收集蛋白样品,经过SDS-PAGE胶分离后,将蛋白转移到固相载体硝酸纤维素薄膜上,固相载体以非共价键形式吸附蛋白质,由于上样前蛋白质经过变性,此时样本中暴露的蛋白表位主要是线性表位。以固相载体上的蛋白质作为抗原,与对应的抗体起免疫反应,再与辣根过氧化物酶酶标记的第二抗体起反应,经过底物显色以检测电泳分离的特异性目的蛋白。

[0059] 将生长状态良好的HMC3细胞铺于6孔板中,5X10⁵/孔,37℃、5% CO₂培养24h后使用。接种ZIKV/SZ01病毒株(GenBank号:KU866423)(0.1MOI)于HMC3细胞,37℃、5% CO₂培养0、12、24、36、48及60h后收集细胞裂解液进行WB。将样本加于5%浓缩胶(PG113,雅酶生物)

和12%分离胶(PG113,雅酶生物)的SDS-PAG胶,在电压80V和120V分别运行20和80min。随后在300mA恒流条件下将蛋白样品转PVDF膜60min。5%脱脂奶粉(TBS溶液配置)封闭60min后,去封闭液,针对拟观察条带预期所处位置进行裁膜,随后分别加入NS2A抗体多肽4抗体、NS1抗体(GTX634158, GeneTex)或E抗体(B1845,北京博奥龙)(1 μ g/ml)以及抗GAPDH抗体,抗体均使用TBS进行稀释,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。使用TBST清洗3次,每次10min。加入HRP标记抗兔二抗(SA00001-2, Proteintech)或抗鼠二抗(SA00001-1, Proteintech),室温孵育1h,用TBST洗10min x 3次。使用显色液(WBKLS0500, Millipore)和全自动化学发光成像分析系统(5200, Tanon)显色。

[0060] 图1中显示了本实验的结果。

[0061] 由图1可见,由多肽4制备的抗体特异性识别ZIKV感染细胞后15-25kDa之间的一条带(与预期的NS2A蛋白相符),且随着ZIKV感染时间的延长而表达升高。由于此表达趋势与ZIKV感染后其NS1蛋白的表达趋势一致,而对于ZIKV结构蛋白E则在24h表达趋于稳定,据此认为抗体能够特异性识别ZIKV NS2A线性表位。在此检测项目中,使用由GeneTex公司购买的NS1抗体(GTX634158)和由北京博奥龙购买的E抗体(B1845)作为病毒感染细胞后对蛋白样品检测的抗体对照。

[0062] 2.将生长状态良好的HMC3细胞铺于6孔板中,5X10⁵/孔,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养24h后使用。接种ZIKV/SZ01病毒株(0.1MOI)于HMC3细胞,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养12、24、48h后收集细胞裂解液进行WB,未感染组(Mock,不添加病毒)作为对照。将样本加于5%浓缩胶和12%分离胶(PG113,雅酶生物)的SDS-PAG胶,在电压80V和120V分别运行20和80min。随后在300mA恒流条件下将蛋白样品转PVDF膜60min。5%脱脂奶粉封闭60min后,去封闭液,加入NS2A抗体多肽1抗体(0.65或1 μ g/ml),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。使用TBST清洗3次,每次10min。加入HRP标记抗兔二抗,室温孵育1h,用TBST洗10minx3次。使用显色液(WBKLS0500, Millipore)和化学发光成像分析系统(5200, Tanon)显色。

[0063] 图2中显示了本实验的结果。

[0064] 由图2可见,虽然使用多肽1制备的抗体在PVDF膜上看到条带,但是在对照组位置均有相应的条带,杂带多,特异性差,不同抗体浓度检测均有杂带。

[0065] 实施例3的实验证明了多肽1诱导产生的抗体经验证不能在WB中有效识别NS2A。与多肽1制备的抗体(多肽1抗体)相比,多肽4制备的抗体(多肽4抗体)可以特异性检测NS2A蛋白。

[0066] 实施例4:多肽抗体(多肽4抗体)的ELISA检测

[0067] 酶联免疫吸附试验(ELISA)是一种酶标固相免疫测定技术,用于检测抗体识别抗原的能力。本实施例的检测原理是:首先将抗原(多肽4)结合到固相载体上,即ELISA板;随后将由兔制备的抗体加入板中,用于识别板中的抗原,然后用洗涤的方法除去未反应的部分;随后使用抗兔-辣根过氧化物酶标记的二抗用于识别板中剩余的抗体,再次用洗涤的方法去除未反应的部分;加入底物,底物与结合在固相载体上的酶催化产生有色物质,通过定性或定量检测有色产物量,可确定样品中抗体的含量。测定值越高,说明与抗原结合的抗体越多,即能识别多肽4的抗体越多。

[0068] 使用PBS包被液将4 μ g/ml的多肽包被于ELISA板,每孔100 μ L,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。第二天,使用PBST洗涤3次,每孔加入100 μ l 3% BSA,37 $^{\circ}$ C封闭1h。待PBST洗涤3次后,将1mg/ml

的多肽4抗体及兔免疫前血清进行稀释,由1:1000二倍比稀释至1:512000。37℃孵育1h。经PBST清洗5次,加入HRP标记的抗兔二抗,37℃孵育1h。PBST洗涤5次后,显色剂显色5-20min,终止液终止,酶标仪上读取OD₄₅₀吸收值。图3中显示了检测的结果。

[0069] 由图3可知,多肽4抗体对多肽4识别的ELISA效价高于1:521000,说明抗体能很好的识别多肽4。

[0070] 实施例5:多肽4抗体的免疫荧光(IF)检测

[0071] 免疫荧光实验,是以抗原-抗体反应为基础,对抗原进行原位表达检测的一种方法。本实施例中的主要原理是:首先将细胞使用固定液固定,用于保护细胞的形成和蛋白的抗原性,由于在实验中样品经过固定,此时蛋白暴露的表位主要为结构表位。随后使用穿孔剂穿孔,使得抗体能够进入细胞内识别抗原。随后使用荧光素标记的二抗识别一抗,从而达到对抗原的原位识别。本实施例用于检测由多肽4制备的兔抗体对目标蛋白NS2A的结构表位的识别。

[0072] 将生长状态良好的Vero细胞铺于已放Vero细胞爬片的24孔板中,5X10⁴/孔,37℃、5% CO₂培养24h后使用。接种0.1MOI的ZIKV/SZ01于Vero细胞,37℃、5% CO₂培养48h后使用。弃上清,用250μL 4%多聚甲醛固定细胞10min。随后使用250μL 0.2% TritonX-100处理细胞10min,PBS清洗细胞2min×3次。3% BSA封闭非特异性抗原30min后,去封闭液,分别加1% BSA稀释的一抗NS2A抗体多肽4抗体、ZIKV E结构表位4G2抗体或由GeneTex公司购买的NS1抗体GTX634158 (5μg/ml) 室温孵育1h。未感染病毒对照组经过同样的处理。随后使用PBS清洗3min×3次,弃上清,加入1% BSA稀释的二抗Alexa Fluor 488Donkey Anti-rabbit IgG(thermo fisher Scientific) (1:1000稀释),室温孵育1h,用PBS洗3min×5次。使用含DAPI的防猝灭封片剂封片。待干片后,于激光共聚焦显微镜下观察实验结果。为检测抗体能否识别ZIKV NS2A的结构表位,对ZIKV感染后的Vero细胞进行检测,结果如图4、图5所示,在感染ZIKV的细胞中观察到NS2A的特异性表达,其主要表达在胞浆。为了评估NS2A抗体的识别效率,发明人使用广泛应用的ZIKV E结构表位4G2抗体和由GeneTex公司购买的NS1抗体GTX634158作为对照。由图4、5可见,ZIKV NS2A抗体与ZIKV E蛋白抗体检测ZIKV对Vero细胞感染率分别为34.29%和47.29%,而NS1抗体检测到的感染率仅有7.09%。NS2A抗体的识别效率显著高于NS1抗体对NS1的识别效率。说明由多肽4制备的抗体能有效识别ZIKV感染后NS2A蛋白的表达。

[0073] 实施例6:多肽4抗体特异性识别寨卡病毒的NS2A

[0074] 为了检测多肽4抗体是否特异性识别ZIKV NS2A,将生长状态良好的BHK21细胞铺于已放细胞爬片的24孔板中,5X10⁴/孔,37℃、5% CO₂培养24h后使用。接种0.1MOI的ZIKV/SZ01、ZIKV/FLR、ZIKV/MR766、DENV-2或YFV-17D病毒株于BHK21细胞,37℃、5% CO₂培养30h后使用。弃上清,用250μL 4%多聚甲醛固定细胞10min。随后使用250μL 0.2% TritonX-100处理细胞10min,PBS清洗细胞2min×3次。3% BSA封闭非特异性抗原30min后,去封闭液,分别加1% BSA稀释的一抗NS2A抗体多肽4抗体 (5μg/ml) 室温孵育1h。使用PBS清洗3min×3次,弃上清,加入1% BSA稀释的二抗Alexa Fluor488Donkey Anti-rabbit IgG(thermo fisher Scientific) (1:1000稀释),室温孵育1h,用PBS洗3min×5次。使用含DAPI的防猝灭封片剂封片。待干片后,于激光共聚焦显微镜下观察实验结果。由图6的A图可见,多肽4抗体有效识别多种ZIKV毒株感染后的细胞,包括ZIKV/SZ01、ZIKV/FLR、ZIKV/MR766,但是不识别

DENV-2和YFV-17D感染细胞,说明多肽4抗体特异性识别寨卡病毒的NS2A。

[0075] 为了进一步检测多肽4抗体是否特异性识别ZIKV NS2A,将生长状态良好的Vero细胞铺于6孔板中,5X10⁵/孔,37℃、5% CO₂培养24h后使用。接种0.1MOI的ZIKV/SZ01、ZIKV/FLR、ZIKV/MR766、DENV-2或YFV-17D病毒株(见Yu, Y., Deng Y.Q., Zou P., et al., A peptide-based viral inactivator inhibits Zika virus infection in pregnant mice and fetuses. Nat Commun, 2017.8:15672) (0.1MOI) 于Vero细胞,37℃、5% CO₂培养36h后收集细胞裂解液进行WB。将样本加于5%浓缩胶(PG113, 雅酶生物)和12%分离胶(PG113, 雅酶生物)的SDS-PAG胶,在电压80V和120V分别运行20和80min。随后在300mA恒流条件下将蛋白样品转PVDF膜60min。5%脱脂奶粉(TBS溶液配置)封闭60min后,去封闭液,针对拟观察条带预期所处位置进行裁膜,随后分别加入NS2A抗体多肽4抗体(1μg/ml)或抗GAPDH抗体,抗体均使用TBS进行稀释,4℃孵育过夜。使用TBST清洗3次,每次10min。加入HRP标记抗兔二抗(SA00001-2, Proteintech)或抗鼠二抗(SA00001-1, Proteintech),室温孵育1h,用TBST洗10min x 3次。使用显色液(WBKLS0500, Millipore)和全自动化学发光成像分析系统(5200, Tanon)显色。由图6的B图可见,多肽4抗体在ZIKV/SZ01、ZIKV/FLR、ZIKV/MR766感染细胞样本中检测到特异性条带,条带大小均处于15-25Kda之间,而在DENV-2和YFV-17D感染细胞中未见特异性条带(图6的B图)。进一步提示,多肽4抗体特异性识别寨卡病毒的NS2A。

[0076] 随后发明人使用MAGE5.1软件将ZIKV/SZ01、ZIKV/FLR、ZIKV/MR766、DENV-2和YFV-17D病毒的NS2A蛋白与多肽4进行比对,发现不同株NS2A对应氨基酸序列与多肽4氨基酸序列100%一致;而DENV-2和YFV-17D的同源性分别为57.1%,和14.3%(图6的C图)。氨基酸序列同源性的差异,可能导致了多肽4对不同黄病毒NS2A蛋白的特异性识别差异。

[0077] 发明人发现抗原分析软件预测的抗原性较高的肽在免疫动物时可能不会诱发特异性抗体。尽管软件考虑到了可能的二级结构,但它主要分析蛋白质的氨基酸序列,可能会丢失一些信息。在无晶体结构的情况下,分析软件不能代替考虑蛋白质的整体构象。因此,抗原预测、动物免疫和抗体特异性检测是用多肽制备抗体所不可缺少的。

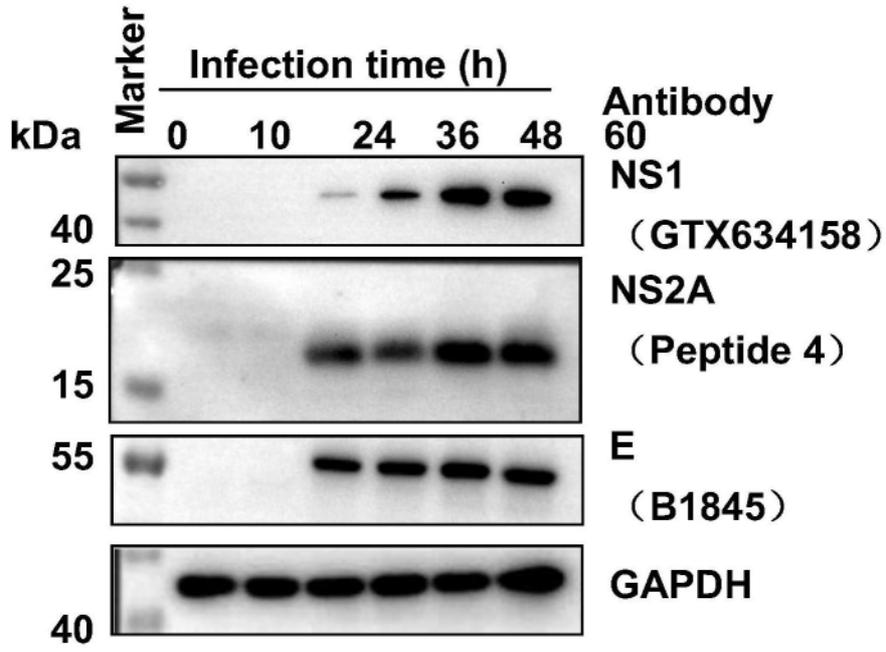


图1

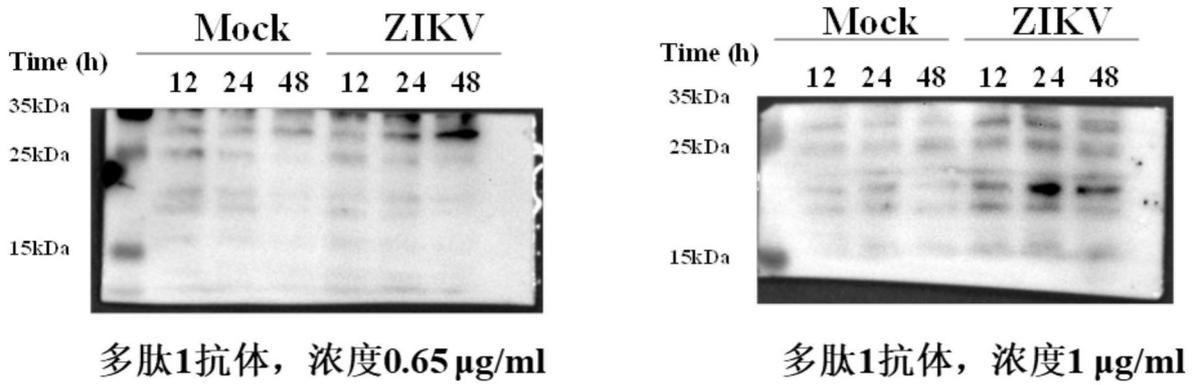


图2

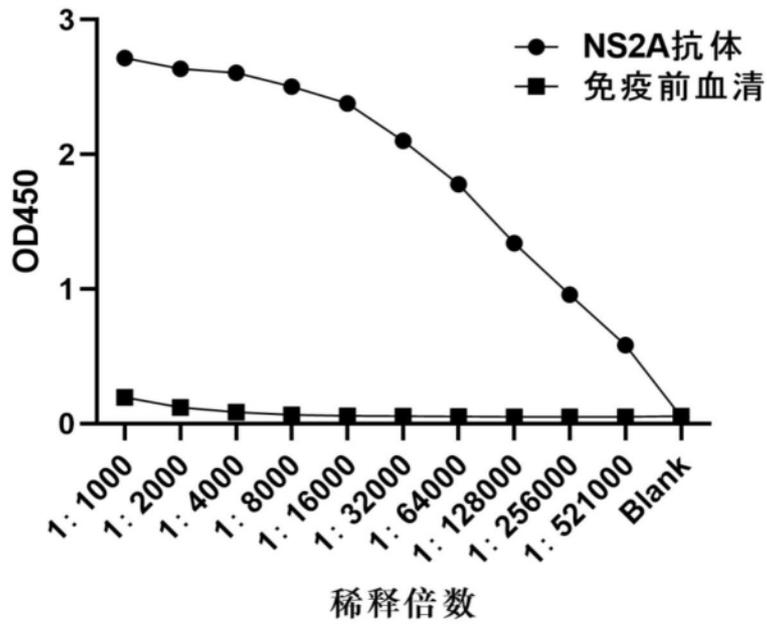


图3

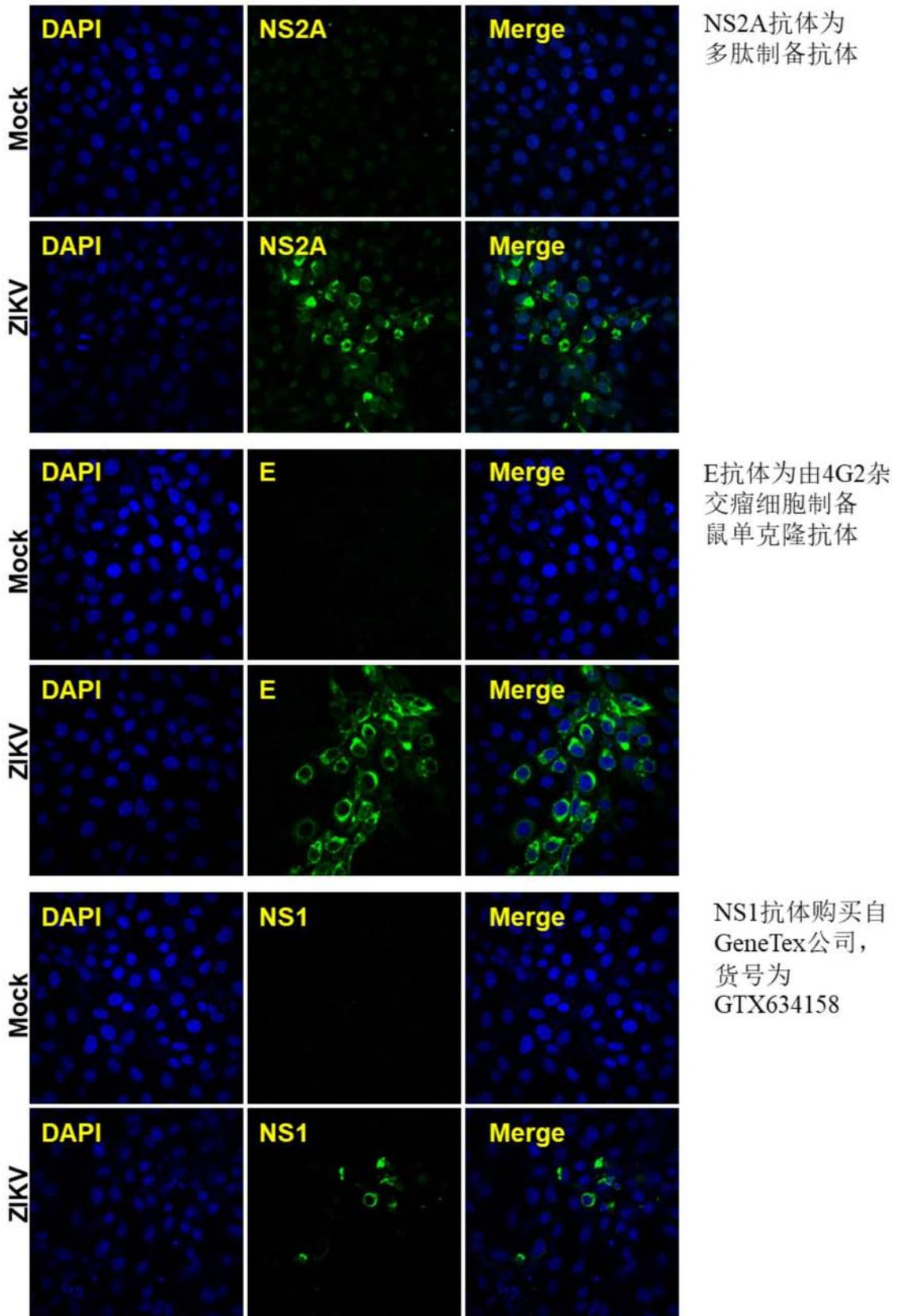


图4

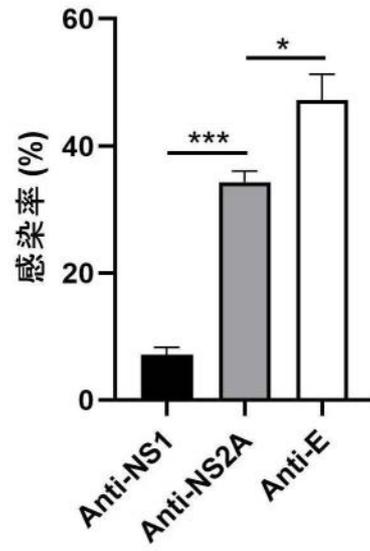
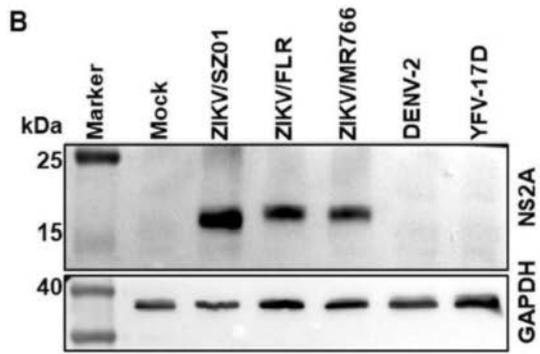
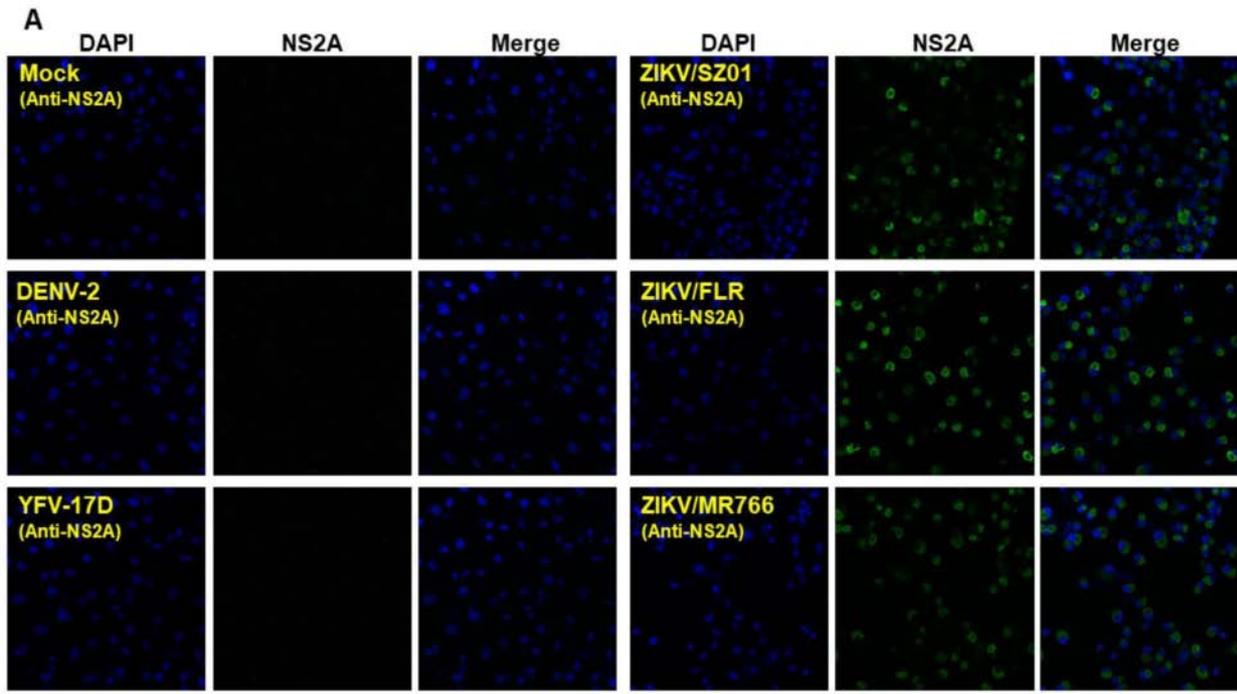


图5



C

Species/Abbrev									*								
1. Peptide_4	G	S	T	D	H	M	D	H	F	S	L	G	V	L	C	-	-
2. ZIKV/SZ01_(KU866423.2)	G	S	T	D	H	M	D	H	F	S	L	G	V	L	-	-	-
3. ZIKV/FLR_(KU820897.5)	G	S	T	D	H	M	D	H	F	S	L	G	V	L	-	-	-
4. ZIKV/MR766_(AY632535.2)	G	S	T	D	H	M	D	H	F	S	L	G	V	L	-	-	-
5. DENV-2_(KM204118.1)	G	-	H	G	Q	I	D	N	F	S	L	G	V	L	G	-	-
6. YFV-17D_(FJ654700.1)	-	-	-	G	E	I	H	A	V	P	F	G	L	V	S	M	M

图6