



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116218789 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 06

(21) 申请号 202310016649.1

G01N 33/577 (2006.01)

(22) 申请日 2023.01.06

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:C2022353 2022.11.29

(71) 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72) 发明人 吴慧光 李晨 陈振海 谢思汉
牟春晓

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

专利代理师 王艳

(51) Int. Cl.

C12N 5/20 (2006.01)

G07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

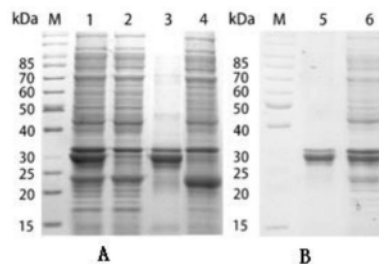
权利要求书1页 说明书9页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一株杂交瘤细胞株、抗PDCoV NS6蛋白的单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株杂交瘤细胞株和由所述杂交瘤细胞株分泌产生的抗PDCoVNS6蛋白的单克隆抗体,所述抗PDCoVNS6蛋白的单克隆抗体一种具有高特异性、能够特异识别PDCoV的NS6蛋白,可用来检测猪 δ 冠状病毒。本发明还公开了所述杂交瘤细胞株在制备含抗PDCoVNS6蛋白的单克隆抗体的试剂、试剂盒或试纸条中的应用。本发明还公开了一种试剂、试剂盒或试纸条,含有所述杂交瘤细胞株和/或所述单克隆抗体。本发明还公开了所述杂交瘤细胞株和/或所述单克隆抗体和/或所述试剂、试剂盒或试纸条在猪 δ 冠状病毒的免疫检测中的应用。



1. 一株杂交瘤细胞株,其特征在於,所述杂交瘤细胞株保藏於中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国武汉,保藏编号为CCTCCN0:C2022353,保藏日期为2022年11月29日。

2. 一种抗PDCoVNS6蛋白的单克隆抗体,其特征在於,所述单克隆抗体由权利要求1所述的杂交瘤细胞株分泌产生。

3. 根据权利要求2所述的抗PDCoVNS6蛋白的单克隆抗体,其特征在於,所述单克隆抗体的重链、轻链的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。

4. 根据权利要求2或3所述的单克隆抗体,其特征在於,所述单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示,所述单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示。

5. 根据权利要求2所述的单克隆抗体,其特征在於,所述单克隆抗体的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.7~9所示;轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.10~12所示。

6. 权利要求1所述的杂交瘤细胞株在制备含抗PDCoVNS6蛋白的单克隆抗体的试剂、试剂盒或试纸条中的应用。

7. 一种试剂、试剂盒或试纸条,其特征在於,含有权利要求1所述杂交瘤细胞株和/或权利要求2~4任一项所述单克隆抗体。

8. 权利要求1所述的杂交瘤细胞株和/或权利要求2~4任一项所述的单克隆抗体和/或权利要求6所述的试剂、试剂盒或试纸条在猪 δ 冠状病毒的免疫检测中的应用。

一株杂交瘤细胞株、抗PDCoV NS6蛋白的单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株杂交瘤细胞株、抗PDCoV NS6蛋白的单克隆抗体及其应用,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)又称为猪丁型冠状病毒、猪三角洲冠状病毒,是具有囊膜的单股正链RNA病毒。猪感染该病毒后主要引起腹泻、发热、精神沉郁、食欲不振等症状,一般仔猪感染较为严重,常导致其脱水死亡。

[0003] PDCoV的基因组大小为21-25kb,包括ORF1a与ORF1b两个开放阅读框,四个结构蛋白纤突(S)蛋白、膜(M)蛋白、囊膜(E)蛋白、核衣壳(N)蛋白,以及3个辅助蛋白NS6、NS7与NS7a。NS6蛋白主要影响病毒滴度与致病力,在干扰素拮抗方面发挥重要作用。有研究表明,缺失NS6基因的病毒感染猪后,被感染猪无任何临床症状。由于PDCoV的发病机制不明确,现在市面上缺乏针对该病的治疗措施与特效药物等。疫苗开发是控制病毒传染病的最好方式,但目前还没有PDCoV的商品化疫苗。单克隆抗体是由单一B细胞克隆产生的高度均一、仅针对某一特定抗原表位的抗体。单克隆抗体以其特异性强、纯度高、均一性好等优点,广泛应用于酶联免疫吸附试验、放射免疫分析、免疫组化和流式细胞仪等技术。单克隆抗体的应用,很大程度上促进了商品化试剂盒的发展。

[0004] 抗原表位是具有一定组成和结构的特殊化学基团,因能与相应抗体或致敏淋巴细胞发生特异性结合,常应用于开发特异性诊断方法或试剂,为疫苗的研发和抗病毒免疫策略等提供新的见解。因此,将抗PDCoVNS6蛋白(核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示)的单克隆抗体与抗原表位发生特异性结合可为研究PDCoV提供有力的工具支持。

发明内容

[0005] 发明目的:本发明所要解决的技术问题是提供了一株杂交瘤细胞株,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国武汉,保藏编号为CCTCC NO:C2022353,保藏日期为2022年11月29日。

[0006] 本发明还要解决的技术问题是提供了一种具有高特异性等特点、能够特异识别PDCoV的NS6蛋白、可以用来检测猪 δ 冠状病毒的抗PDCoV NS6蛋白的单克隆抗体,由所述的杂交瘤细胞株分泌产生。

[0007] 本发明还要解决的技术问题是提供了所述杂交瘤细胞株在制备含抗PDCoV NS6蛋白的单克隆抗体的试剂、试剂盒或试纸条中的应用。

[0008] 本发明还要解决的技术问题是提供了一种试剂、试剂盒或试纸条,含有所述杂交瘤细胞株和/或所述单克隆抗体。

[0009] 本发明还要解决的技术问题是提供了所述杂交瘤细胞株和/或所述单克隆抗体和/或所述试剂、试剂盒或试纸条在猪 δ 冠状病毒的免疫检测中的应用。

[0010] 技术方案:为解决上述技术问题,本发明提供了一株杂交瘤细胞株,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国武汉,保藏编号为CCTCC NO:C2022353,保藏日期为2022年11月29日。

[0011] 本发明还提供了一种抗PDCoV NS6蛋白的单克隆抗体,由所述的杂交瘤细胞株分泌产生。

[0012] 其中,所述单克隆抗体的重链、轻链的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。

[0013] 其中,所述单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示,所述单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示。

[0014] 其中,所述单克隆抗体的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.7~9所示;轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.10~12所示。

[0015] 本发明还提供了所述杂交瘤细胞株在制备含抗PDCoV NS6蛋白的单克隆抗体的试剂、试剂盒或试纸条中的应用。

[0016] 本发明还提供了一种试剂、试剂盒或试纸条,含有所述杂交瘤细胞株和/或所述单克隆抗体。

[0017] 本发明还提供了所述杂交瘤细胞株和/或所述单克隆抗体和/或所述试剂、试剂盒或试纸条在猪 δ 冠状病毒的免疫检测中的应用。

[0018] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有如下显著优点:

[0019] 1、本发明将NS6蛋白与GST结合形成融合蛋白,该融合蛋白有利于NS6蛋白在大肠杆菌中正确折叠并能够提高NS6蛋白的免疫原性;

[0020] 2、本发明获得的一株分泌抗PDCoV NS6蛋白的单克隆杂交瘤细胞株,可分泌具有高特异性等特点的单克隆抗体;

[0021] 3、抗PDCoV NS6蛋白的单克隆抗体能够特异识别PDCoV的NS6蛋白;

[0022] 4、抗PDCoV NS6蛋白的单克隆抗体可以用来检测猪 δ 冠状病毒,对研究PDCoV具有重要意义,也为其提供了有力的工具支持。

附图说明

[0023] 图1A为pGEX-6P-1-NS6重组蛋白的表达,图1B为pGEX-6P-1-NS6重组蛋白的纯化;

[0024] 图2为pCAGGS-3flag-NS6转染HEK-293A细胞后用PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体进行IFA检测,图2A为阴性对照(转染pCAGGS-3flag),图2B为试验组(pCAGGS-3flag-NS6转染HEK-293A,出现特异性荧光);

[0025] 图3为pCAGGS-3flag-NS6转染HEK-293A细胞后用PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体进行Western blot试验。M为相对分子质量标准,单位kDa,泳道1阴性对照(转染pCAGGS-3flag的细胞裂解液),泳道2试验组(转染pCAGGS-3flag-NS6的细胞裂解液,有特异性条带,大小为15kDa左右);

[0026] 图4为PDCoV感染LLC-PKI细胞后,PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体的IFA检测图;图4A阴性对照组(LLC-PKI未感染PDCoV),图4B试验组(LLC-PKI感染PDCoV,出现特异性荧光);

[0027] 图5为PDCoV感染LLC-PKI细胞后,PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体的Western blot图,M为相对分子质量标准,单位kDa,泳道1阴性对照(未感染PDCoV的LLC-PKI细胞裂解液),泳道2试验组(感染PDCoV的LLC-PKI细胞裂解液);

[0028] 图6为PDCoV感染LLC-PKI细胞后,用稀释度分别为1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000的PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体作为一抗的IFA检测图;

[0029] 图7为PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体的抗原表位鉴定Western blot试验;图7A为NS6基因逐步截短示意图,图7B为Western blot检测结果图;

[0030] 图8为抗原表位区域⁷⁰EYGSYKDFI⁸⁰与Genbank上181株PDCoVNS6基因的氨基酸序列的比对结果(11株PDCoV在此抗原表位区域发生了个别氨基酸突变)。

具体实施方式

[0031] 下面结合附图对本发明的技术方案作进一步说明。

[0032] 溶液:

[0033] 磷酸盐缓冲液(PBS):称取氯化钠8g、氯化钾0.2g、磷酸氢二钠1.42g和磷酸二氢钾0.27g,溶于800mL蒸馏水中,调PH至7.4,定容至1L。

[0034] 4%多聚甲醛溶液:称取4g多聚甲醛粉末溶于100ml PBS中。

[0035] 0.1%Triton X-100溶液:吸取10 μ l Triton X-100稀释于10ml PBS中。

[0036] 2%BSA溶液:称取2g BSA粉末溶于100ml PBS中。

[0037] 试剂:50%PEG1500(上海希格玛高技术有限公司,简称Sigma公司)。

[0038] 培养基:

[0039] LB培养基:称取胰蛋白胨(Tryptone)10g、酵母膏(Yeast Extract)5g和NaCl 10g,溶于800ml蒸馏水中,定容至1L。

[0040] HAT培养基:2%的50 \times HAT(北京博奥龙免疫技术有限公司)、12%的胎牛血清(Sigma公司)、1%的100 \times 青链霉素(北京索莱宝科技有限公司)和85%的DMEM(Grand Island Biological Company)。

[0041] HT培养基:2%的50 \times HT(北京博奥龙免疫技术有限公司)、12%的胎牛血清、1%的100 \times 青链霉素和85%的DMEM。

[0042] LLC-PKI培养基:10%的胎牛血清、1%的1M HEPES(4-羟乙基哌嗪乙磺酸)溶液与100 \times 青链霉素、88%的MEM。

[0043] 冠状病毒培养基:10%的胰蛋白胨磷酸盐肉汤(TPB)、0.0002%的胰酶、1%的100 \times 青链霉素和89%的DMEM。

[0044] 实施例1 pGEX-6P-1-NS6重组蛋白的获取与制备

[0045] 根据GenBank中猪 δ 冠状病毒毒株CHN-GD16-05全基因组查找NS6基因序列,设计-对特异性引物PDCoV-NS6-F与PDCoV-NS6-R,并在其上下游分别插入酶切位点Bam HI与Sal I(下划线为酶切位点)。

[0046] 表1

	引物名称	引物序列(5'-3')	序列号
[0047]	PDCoV-NS6-F	TGGGATCCATGTGCAACTGCCATCTGCA	SEQ ID NO.13
	PDCoV-NS6-R	GAGTCGACTTAATTTAATTCATCTTCAAGAATG	SEQ ID NO.14

[0048] 进一步的进行RT-PCR扩增,将CHN-GD16-05株病毒RNA基因组反转录为cDNA,用设计的引物扩增NS6基因,PCR反应体系总体积为50 μ l:

[0049] 表2

	成分	体积 (50 μ l)
	ddH ₂ O	21 μ l
[0050]	PrimeSTAR [®] Max DNA Polymerase	25 μ l
	PDCoV-NS6-F	1 μ l
	PDCoV-NS6-R	1 μ l
	cDNA (PDCoV)	2 μ l

[0051] 反应条件:98 $^{\circ}$ C预变性3min;98 $^{\circ}$ C变性15s、55 $^{\circ}$ C退火10s、72 $^{\circ}$ C延伸30s,此步骤进行30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。然后,通过PCR纯化试剂盒(Omega Therapeutics, Inc.)进行PCR纯化,进一步的进行核酸电泳并使用核酸胶回收试剂盒(Omega Therapeutics, Inc.)回收胶进行酶切处理。

[0052] 扩增出的NS6基因用Bam HI (Code No.1010S)与Sal I (Code No.1080S)限制性内切酶(宝日医生物技术(北京)有限公司),进行酶切处理,酶切体系为50 μ l:

[0053] 表3

	成分	体积 (50 μ l)
	ddH ₂ O	29 μ l
[0054]	10 \times M (Buffer 缓冲液)	5 μ l
	<i>Bam</i> HI	0.5 μ l
	<i>Sal</i> I	0.5 μ l
	DNA (NS6)	15 μ l

[0055] 反应体系配好后置于37 $^{\circ}$ C恒温箱放置4h,将酶切后的基因连接到带有对应酶切位点的pGEX-6P-1质粒载体(本实验室保存)中构建原核表达载体pGEX-6P-1-NS6,经PCR鉴定或酶切鉴定。构建成功后,即得重组质粒;将重组质粒转入BL21大肠杆菌菌种中,挑取单个克隆菌群接种于LB培养基(带氨苄青霉素)中,待细菌增殖OD值达到0.5左右,加入IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)进行诱导表达,并置于16 $^{\circ}$ C恒温箱持续培养12h。5000r/min离心10min收集细菌进行超声破碎,破碎后收集上清进行SDS-PAGE分析,该蛋白在目标大小位置

30kDa左右出现特异性条带且在细菌沉淀中表达。如图1A所示,泳道1为PGEX-6P-1-NS6破碎后的全菌、泳道2为PGEX-6P-1-NS6破碎后的上清液、泳道3为PGEX-6P-1-NS6破碎后的沉淀、泳道4为PGEX-6P-1破碎后的全菌(对照)。由此可见,通过SDS-PAGE切胶纯化得到大量相对较纯的目的蛋白。如图1B所示,泳道5为纯化后的PGEX-6P-1-NS6蛋白、泳道6为PGEX-6P-1-NS6破碎后的全菌(对照)。

[0056] 实施例2小鼠免疫

[0057] 将实施例1获得的PDCoV NS6重组蛋白与弗氏完全佐剂(Sigma公司)1:1等体积混合,放入两颗研磨珠于震荡研磨机中震荡研磨使其变为白色粘稠液体,200 μ l/80 μ g蛋白的剂量皮下多点注射6-8周龄Balb/c小鼠(购自扬州大学动物实验中心),间隔14d,进行第二次免疫,重组蛋白1:1等体积与弗氏不完全佐剂混合,200 μ l/80 μ g蛋白的剂量皮下多点注射;间隔14d,进行第三次免疫,免疫策略同第二次相同;7-10d,小鼠眼眶静脉丛采血,抗体效价达到1:1000,间隔3周进行冲击免疫,直接腹腔注射200 μ l/80 μ g重组蛋白,三天后进行细胞融合。

[0058] 实施例3细胞融合

[0059] 饲养细胞的准备:取一只未免疫的小鼠,将其脱颈致死,浸泡于75%的酒精中5min,于生物安全柜中剪开腹部皮肤(腹膜不能剪破),暴露其腹腔,用灭菌注射器吸取8ml HAT培养基,注入小鼠腹腔,轻柔按摩其腹部几下,将液体回抽,重新与HAT培养基混合均匀总体积为36ml,铺于3块24孔板,每孔500 μ l。

[0060] 脾细胞的准备:将实施例2中的小鼠脱颈处死,无菌操作取小鼠的脾脏于2ml DMEM培养基中,用注射器针头多次穿刺脾脏,直至脾脏的细胞全部释放出来,收集液体于50ml离心管中补加DMEM到20ml,离心收集脾细胞。

[0061] 骨髓瘤细胞(sp2/0)的准备:将本实验室保存的骨髓瘤细胞(sp2/0)通过移液器吹打下来收集到50ml离心管中,1000r/min离心5min,弃上清,再用DMEM重悬。

[0062] 细胞融合开始前所用到的培养基与试剂等均放到37 $^{\circ}$ C温箱中预热。

[0063] 细胞融合:将骨髓瘤细胞(sp2/0)与脾细胞个数按1:5充分混合于50ml离心管中,离心弃掉上清只保留细胞,轻轻拍打管壁底部,使其均匀分散到管壁底部四周,将离心管置于37 $^{\circ}$ C烧杯中,缓慢旋转管壁并逐滴加入1ml 50%PEG1500,1min内加完;继续旋转管壁20s;逐滴加入2ml DMEM,2min内加完;补加DMEM至20ml,1000r/min离心10min,弃掉上清,用HAT培养基轻轻重悬底部细胞并补加至36ml,铺于事先加好饲养细胞的3块24孔板,每孔500 μ l。置于37 $^{\circ}$ C、含有5%CO₂的细胞培养箱中培养。

[0064] 实施例4 IFA初筛与亚克隆

[0065] 第5天、第7天用HAT培养基进行半量换液,第8天、第9天待细胞长满孔底2/3进行IFA检测阳性孔。确定阳性孔后,改用HT培养基将该孔细胞扩大培养并进行亚克隆。亚克隆步骤为细胞计数并取约500个细胞稀释到20ml预先加入饲养细胞的HT培养基中混合均匀,每孔100 μ l铺于2块96孔板。待细胞生长到孔底面积的50%时,吸取50 μ l单个克隆孔的上清进行IFA检测。阳性孔再进行一轮亚克隆,方法同上,即得到阳性单克隆杂交瘤细胞株PDCoV-NS6-5-A11。将该杂交瘤细胞株PDCoV-NS6-5-A11保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国武汉,保藏编号为CCTCC NO:C2022353,保藏日期为2022年11月29日。

[0066] 实施例5 PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体(腹水)的制备

[0067] 单克隆阳性杂交瘤细胞株PDCoV-NS6-5-A11扩大培养后,大概收集 2.5×10^6 个细胞,用500 μ l DMEM重悬细胞,注射于事先打过500 μ l液体石蜡小鼠的腹腔。7d后,小鼠腹部明显膨大,针头穿刺收集腹水于10ml离心管中,1500r/min离心10min,吸取上清,即得PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体(腹水),分装后于-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱中保存。

[0068] 实施例6 PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体的特异性鉴定

[0069] 根据NS6基因设计-对酶切位点分别为Kpn I与Xho I的特异性引物,将NS6基因插入到对应酶切位点的pCAGGS-3flag真核表达质粒(Identification of a B-Cell Epitope in the VP3 Protein of Senecavirus A, Mi Chen)当中,构建程序同实施例1。

[0070] 表4

	引物名称	引物序列(5'-3')	序列号
[0071]	pCAGGS-3flag-NS6-F	AATGGGGTACCATGTGCAACTGCCATCT	SEQ ID NO.15
	pCAGGS-3flag-NS6-R	CCGCCTCGAGTTAATTTAATTCATCTTCAAG	SEQ ID NO.16

[0072] 构建好的PCAGGS-3flag-NS6真核表达质粒,转染HEK-293A细胞24h后,用PDCoV-NS6-5-A11单克隆抗体作为一抗,分别进行IFA与Western blot检测。IFA检测结果如图2所示,只转染pCAGGS-3flag的细胞无荧光显示(图2A),而转染pCAGGS-3flag-NS6的细胞出现特异性荧光(图2B)。Western blot检测结果如图3所示,转染pCAGGS-3flag的细胞裂解液没有条带出现(泳道1),而转染pCAGGS-3flag-NS6的细胞裂解液出现特异性条带(泳道2,大小15kDa左右)。IFA与Western blot结果证明,PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体特异性识别PDCoV NS6蛋白。

[0073] 实施例7 PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体与天然的PDCoV NS6蛋白反应

[0074] PDCoV感染LLC-PKI细胞后分别进行IFA与Western blot检测,PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体为一抗。IFA结果显示(图4),感染PDCoV的LLC-PKI细胞出现特异性荧光(图4B),没有感染PDCoV的LLC-PKI细胞无荧光显示(图4A)。Western blot结果显示(图5),感染PDCoV的LLC-PKI细胞裂解液中出现特异性条带(泳道2,大小11kDa左右),而没有感染PDCoV的LLC-PKI细胞裂解液无任何条带显示。IFA与Western blot试验结果均证明,PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体与天然的PDCoV NS6蛋白反应。

[0075] 实施例8 PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体的反应敏感性检测

[0076] 用PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体从1:1000开始倍比稀释,使稀释度分别为1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000作为一抗分别与正常的LLC-PKI细胞和感染PDCoV的LLC-PKI细胞反应,之后用DyLight 488,GoatAnti-Mouse IgG(488标记的山羊抗鼠IgG,Abbkine,Inc公司)作为二抗,于倒置荧光显微镜下观察结果,并通过计算机荧光采集系统拍摄结果并保存。结果显示(图6),该抗体在1:4000倍内稀释荧光效果最好(图6A、C、E、G),最高稀释倍数可达到1:16000倍(图6I),阴性对照组无荧光显示(正常的LLC-PKI细胞,如图6B、D、F、H、J),证明该抗体效价高且结果成立。

[0077] 实施例9 PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体的表位鉴定

[0078] 根据NS6基因,分步设计不同片段的特异性引物,以实施例1中相同程序分别将NS6基因截短的不同片段构建至真核表达质粒pEGFP-C3中,转染HEK-293A细胞,24h收集细胞,制备细胞样品进行Western blot试验(以PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体为一抗,HRP

Goat Anti-Mouse IgG(武汉爱博泰克生物科技有限公司)为二抗)。先将NS6基因分成4个片段,每两个片段之间重叠10-20个氨基酸(图7A,NS6-A、NS6-B、NS6-C、NS6-D),结果表明抗原表位定位于NS6-D(图7B1,泳道NS6-D出现特异性条带);进一步将NS6-D分别从N端与C端缩减13与14位氨基酸(图7A,NS6-D-1、NS6-D-2),抗原表位定位于NS6-D-1(图7B2,泳道NS6-D-1出现特异性条带);进一步将NS6-D-1从C端缩减1位氨基酸(图7A,NS6-D-1-C79)后不能检测出特异性条带(图7B3,泳道NS6-D-1-C79),说明PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体识别的抗原表位C端位置截止到第80位;将NS6-D-1的N端缩减2位氨基酸后仍能够检测出特异性条带(图7B4,泳道NS6-D-1-N63);进一步将NS6-D-1-N63从C端分别缩减6位氨基酸与7位氨基酸(图7A,NS6-D-1-N70、NS6-D-1-N71),NS6-D-1-N70能够检测出特异性条带而NS6-D-1-N71不能(图7B5),说明PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体识别的抗原表位N端位置截止到第70位。以上结果证明,PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体最终确定识别的抗原表位为NS6基因的第70至80位氨基酸⁷⁰EYGSYKDFI⁸⁰。

[0079] 实施例10 PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体抗原表位序列比对

[0080] 将⁷⁰EYGSYKDFI⁸⁰与NCBI中已公布的181株PDCoV全基因组序列利用Jalview软件进行序列比对,比对结果如图8所示,仅发现其中11株毒株在该抗原表位区域个别氨基酸发生突变,说明PDCoV-NS6-5-A11分泌的单克隆抗体能识别绝大多数PDCoV毒株。

[0081] 以上所有实施例中所述的间接免疫荧光试验(IFA)应用具体如下:

[0082] 抗原制备:将LLC-PKI细胞铺于96孔板,置于37℃含5%CO₂的温箱中培养24h,细胞长满孔底。将96孔板中原培养基上清弃掉,每孔100μl用高压灭菌后的PBS清洗两遍,每孔接入50μl病毒液(含200TCID₅₀),置于37℃含5%CO₂的温箱中培养15h,约四分之一细胞病变死亡后弃掉病毒液;用4%的多聚甲醛溶液固定15min,每孔50μl;0.1%TritonX-100溶液通透30min,每孔50μl;2%BSA封闭30min,每孔50μl;

[0083] 一抗孵育:每孔加入待测样品(小鼠血清、细胞培养上清或单克隆抗体),4℃过夜;

[0084] 二抗孵育:每孔加入50μl的1:2000稀释的DyLight 488,Goat Anti-Mouse IgG,室温孵育2h;

[0085] 以上每步结束后均需PBS洗2遍,每次2min,最后1遍拍干即可,于倒置荧光显微镜下拍照观察结果。

[0086] 以上所有实施例中所述的Western blot试验应用具体如下:

[0087] 细胞样品制备:收集细胞加入适量RIPA裂解液(碧云天生物技术有限公司)置于冰上,摇床孵育20min,12000r/min离心10min收集细胞裂解液上清,加入Loading Buffer,100℃煮沸5min。

[0088] 转膜:制备好的细胞样品在电压80V的条件下进行SDS-PAGE电泳,电泳结束后将凝胶上的条带在电流200mA条件下转移至PVDF膜上(PVDF膜在使用时,预先用甲醇浸泡激活)。

[0089] 封闭:转膜结束后,用5%的脱脂奶粉溶液摇床孵育2h;

[0090] 一抗孵育:用制备的单克隆抗体1:1000稀释,4℃摇床过夜封闭;

[0091] 二抗孵育:用HRP Goat Anti-Mouse IgG(武汉爱博泰克生物科技有限公司)1:10000稀释作为二抗,室温摇床孵育1h;

[0092] 显色:发光液A与B(苏州新赛美生物科技有限公司)等体积混合,滴加于PVDF膜上,在计算机成像系统下拍照保存。

[0093] 实施例11单克隆抗体的轻重链可变区序列测定

[0094] 通过RNA提取试剂盒(天根科技生化有限公司)提取分泌抗PDCoV NS6蛋白的杂交瘤细胞株PDCoV-NS6-5-A11的总RNA,进一步通过反转录试剂盒将其反转录为cDNA。

[0095] 设计轻链可变区引物序列:

[0096] 表5

引物名称	引物序列 (5'-3')	序列号
VL-F1	ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG	SEQ ID NO.17
VL-F2	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT	SEQ ID NO.18
[0097] VL-F3	ATGGAGWCACAKWCTCAGGTCTTTRTA	SEQ ID NO.19
VL-F4	ATGKCCCCWRCTCAGYTYCTKGT	SEQ ID NO.20
VL-F4	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTG	SEQ ID NO.21
VL-R	GGATACAGTTGGTGCAGCATCAGCCCGTTT	SEQ ID NO.22

[0098] 设计重链可变区引物序列:

[0099] 表6

引物名称	引物序列 (5'-3')	序列号
VH-F1	SAGGTGMAGCTKCASSARTCWGG	SEQ ID NO.23
[0100] VH-F2	ATGGRATGSAGCTGKGMTATSCTCT	SEQ ID NO.24
VH-F3	ATGRACCTCGGGYTGAGCTKGGTTTT	SEQ ID NO.25
VH-F4	ATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT	SEQ ID NO.26
VH-R	TGGGGSTGTYGTTTTGGCTGMRGAGACRGTGA	SEQ ID NO.27

[0101] 表7

成分	体积
ddH ₂ O	39 μ l
10 \times PCR Buffer	5 μ l
rTaq	0.25 μ l
dNTP Mix	2.75 μ l
上游引物	0.5 μ l
下游引物	0.5 μ l
cDNA	2 μ l

[0103] PCR反应程序:98 $^{\circ}$ C预变性3min;98 $^{\circ}$ C变性10s、55 $^{\circ}$ C退火15s、72 $^{\circ}$ C延伸30s,此步骤

33个循环;72℃延伸5min。

[0104] 进一步的将PCR产物通过试剂盒纯化后与pMD19-T载体(宝日医生物技术(北京)有限公司,Takara公司)进行连接,挑取对应的阳性克隆质粒送至擎科生物科技有限公司(南京)进行测序。测定单克隆抗体的重链可变区、轻链可变区氨基酸序列分别为SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4所示。重链可变区、轻链可变区核苷酸序列分别为SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6所示。重链可变区的CDR1、CDR2与CDR3氨基酸序列分别为SEQ IDNO.7~9所示(SEQ ID NO.7:GYAFTNFL;SEQ ID NO.8:INPGNGAT;SEQ ID NO.9:VR),轻链可变区的CDR1、CDR2、与CDR3氨基酸序列分别为SEQ ID NO.10~12所示(SEQ ID NO.10:KSVGTSYGYSY;SEQ ID NO.11:LAS;SEQ ID NO.12:QHNREMP)。

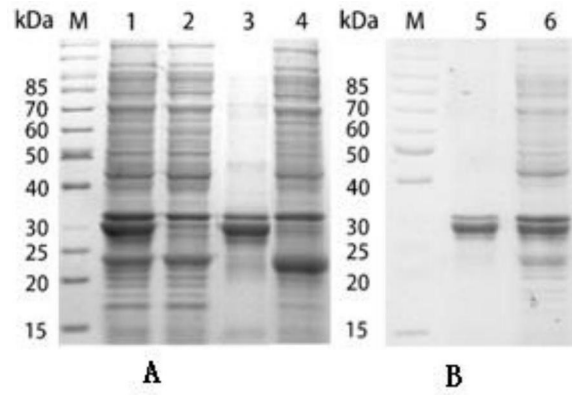


图1

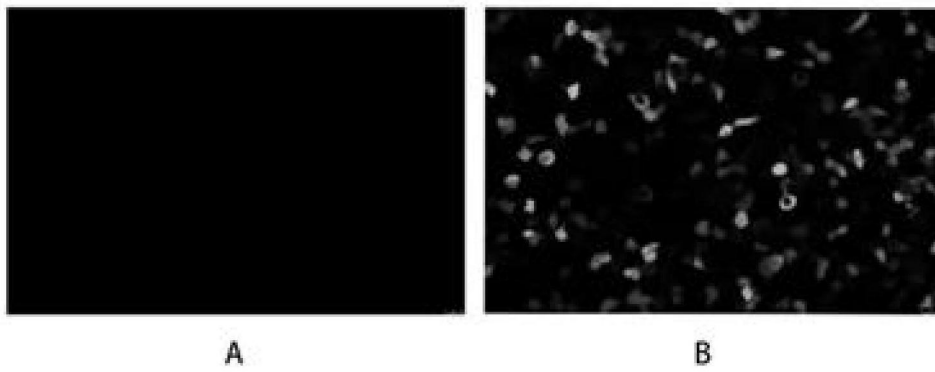


图2

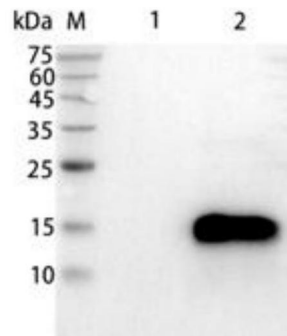


图3

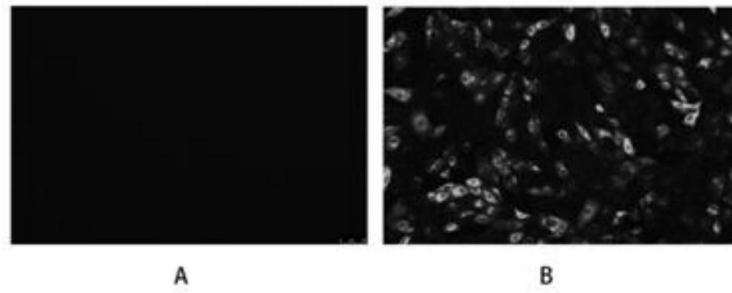


图4

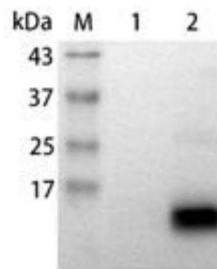


图5

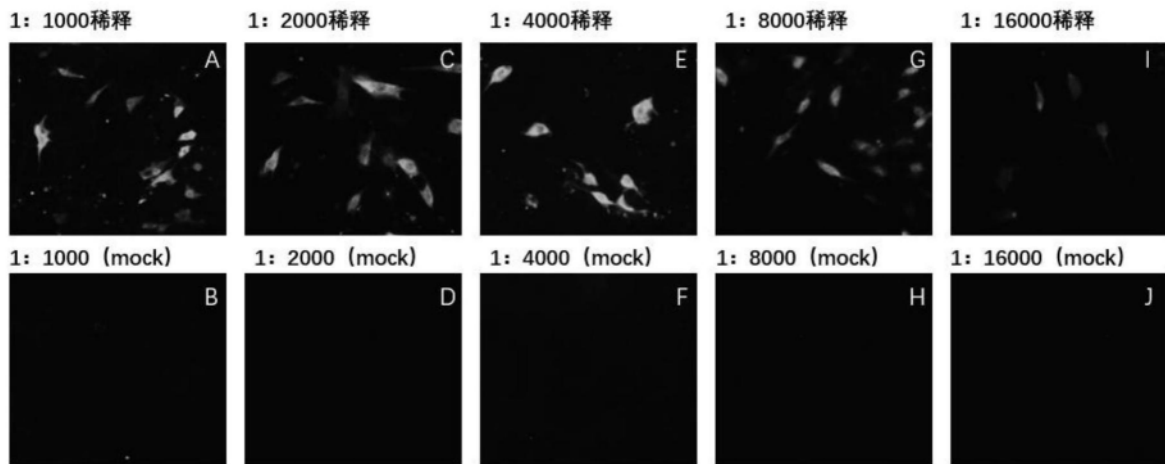
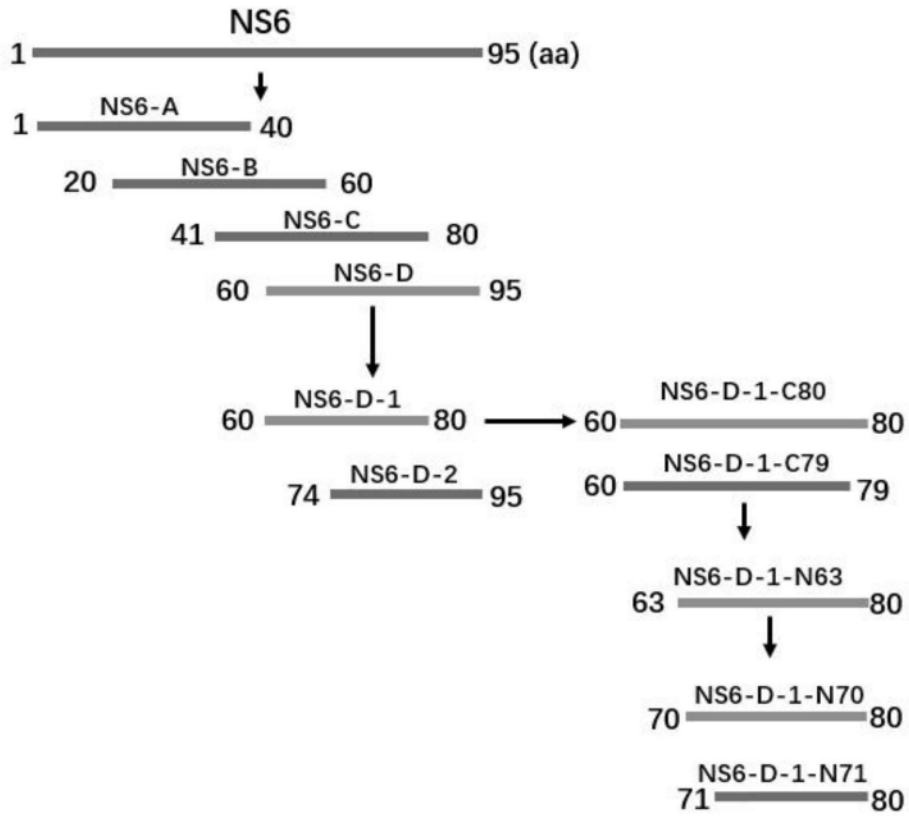
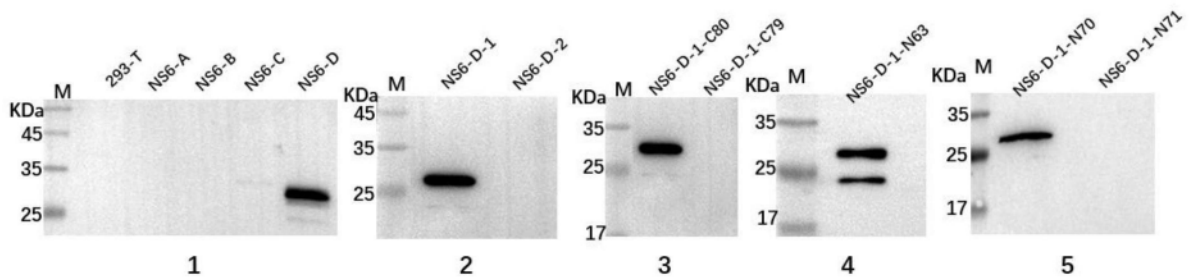


图6



A



B

图7

KY363868 CHN-GD16-05	E Y G S I Y G K D F I
KX361343 PDCoV/0213/Thailand T
KX361344 PDCoV/0213/Thailand T
KY513724 CH/Hunan/2014	. . . T
MF642322 CHN/GS/2016/1	. . R
MF642323 CHN/GS/2016/2	. . R . L
MF642325 CHN/QH/2017/1	. . R . L
MF642324 CHN/GS/2017/1	. . R . L
MN781985 CHzmd2019	D S
MZ802777 RBR-1/2016/Thailand T
MZ388471 CH/GX/PDCoV/1491B	K
OM777140 NTU/C253/21	. . . N

图8