



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110221080 A

(43)申请公布日 2019.09.10

(21)申请号 201910555785.1

C12N 5/20(2006.01)

(22)申请日 2019.06.25

C07K 16/10(2006.01)

(71)申请人 上海交通大学

C12N 15/40(2006.01)

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

C12N 15/70(2006.01)

C12R 1/91(2006.01)

(72)发明人 王大鹏

(74)专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限公司 31220

代理人 郑立

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

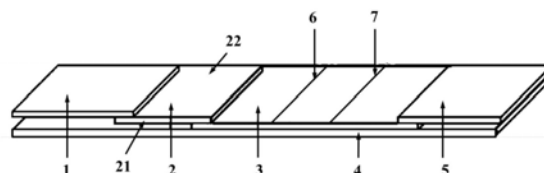
权利要求书2页 说明书11页 附图3页

(54)发明名称

一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒及细胞株

(57)摘要

本发明公开了一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒,涉及分子生物学与免疫学领域,包括固相载体、检测抗体和样品处理液,其中固相载体包括样品垫、胶体金结合垫、具有检测线和质控线的承载膜、吸收垫及底板,胶体金结合垫包括结合垫本体和涂覆于结合垫本体上的胶体金标记抗体涂层;本发明还公开了相应的特异性细胞株。本发明通过人源诺如病毒S区衣壳蛋白抗体的制备,解决了现有技术制备工艺复杂、蛋白免疫学活性损失达、特异性差等问题,获得的单克隆抗体构建了人源诺如病毒的免疫胶体金检测体系,具有快速、简便、高效、检测谱广且更加安全的优点。



1. 一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒, 其特征在于, 包括固相载体、检测抗体和样品处理液, 其中所述固相载体包括样品垫、胶体金结合垫、具有检测线和质控线的承载膜、吸收垫及底板, 所述胶体金结合垫包括结合垫本体和涂覆于所述结合垫本体上的胶体金标记抗体涂层, 所述检测线为能够与所述胶体金标记抗体特异性结合的配对抗体形成的涂层, 所述检测线位于所述承载膜的靠近所述胶体金结合垫一端, 所述质控线位于所述承载膜的靠近所述吸收垫一端。

2. 如权利要求1所述的一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒, 其特征在于, 所述胶体金结合垫和所述检测线使用的抗体为人源诺如病毒S (GI/GII) 区衣壳蛋白的单克隆抗体; 所述质控线为羊抗鼠二抗形成的涂层。

3. 如权利要求1所述的一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒, 其特征在于, 所述承载膜采用NC膜, 所述底板采用PVC材料。

4. 如权利要求1所述的一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒, 其特征在于, 所述样品处理液包括PBS溶液和DTT溶液, 其中所述PBS溶液的pH值为9, 所述DTT溶液的浓度为10.0% (w/v)。

5. 如权利要求1所述的一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒中所述固相载体和所述检测抗体的搭配组合可采用以下方式: (1) 纳米金颗粒标记的所述单克隆抗体与同种的所述单克隆抗体搭配; (2) 纳米金颗粒标记的所述单克隆抗体与对应的所述单克隆抗体中具有不同抗原表位的单克隆抗体搭配。

6. 如权利要求1所述的一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒, 其特征在于, 所述人源诺如病毒S (GI/GII) 区衣壳蛋白的单克隆抗体通过以下步骤制备:

步骤一、扩增所述人源诺如病毒S (GI/GII) 区衣壳蛋白编码区基因, 通过限制性内切酶在酶切位点酶切将其插入原核表达载体pET-28a, 得到重组表达质粒pET28a-S (GI/GII), 其中所述酶切位点为上游EcoR I, 下游Xho I;

步骤二、将所述步骤一中得到的所述重组表达质粒pET28a-S (GI/GII) 转化至大肠杆菌BL21, 加入诱导剂诱导所述S (GI/GII) 区衣壳蛋白的表达, 得到诱导后的重组细菌;

步骤三、收集并破碎诱导后的所述重组细菌免疫实验动物; 免疫后, 适时融合所述免疫实验动物的脾细胞与骨髓瘤, 以差异性ELISA法筛选杂交瘤细胞株, 获得只分泌所述S (GI/GII) 区衣壳蛋白的特异性抗体的阳性细胞株, 所述阳性细胞株通过普通培养法得到含有只针对所述S (GI/GII) 区衣壳蛋白的单克隆抗体细胞上清液, 或者将所述细胞株注入所述免疫实验动物腹腔内获得含有只针对所述S (GI/GII) 区衣壳蛋白的所述单克隆抗体的腹水;

步骤四、将所述步骤三中得到的含有所述单克隆抗体的细胞培养上清液或腹水进行纯化, 得到纯化的所述人源诺如病毒S (GI/GII) 区衣壳蛋白的单克隆抗体。

7. 如权利要求6所述的一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒, 其特征在于, 所述步骤一中还需引入上游扩增引物P1和下游扩增引物P2, 针对所述人源诺如病毒S (GI) 区衣壳蛋白的所述上游扩增引物和下游扩增引物的核酸序列分别为5' GAATTCATGATGATGGCGTCTAAG 3' 和5' CTCGAGCTCCACCGTAGGAGGGAC 3'; 针对所述人源诺如病毒S (G II) 区衣壳蛋白的所述上游扩增引物和下游扩增引物的核酸序列分别为5' GAATTCATGAAGATGGCGTCGAGTG3' 和5' CTCGAGCTCAACTGTGGGTGGCAC 3'。

8. 如权利要求6所述的一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒, 其特征在于, 所述差异性

ELISA法筛选为含所述重组表达质粒pET28a-S (GI/GII) 和空的所述原核表达载体pET-28a的所述诱导后的重组细菌的裂解物包被固相载体,分别与待筛选的单克隆抗体细胞株所分泌的抗体进行反应,只与含所述重组表达质粒pET28a-S (GI/GII) 的所述诱导后的重组细菌的裂解物反应,而不与空的所述原核表达载体pET-28a的所述诱导后的重组细菌的裂解物反应的细胞株定为阳性,从而获得分泌针对不同基因型诺如病毒S区衣壳蛋白抗体的阳性细胞株。

9. 一种只分泌针对人源诺如病毒S (GI/GII) 区衣壳蛋白抗体的阳性细胞株,其特征在于,所述阳性细胞株为一种杂交瘤细胞株,保藏编号为CCTCC C2018185。

10. 一种只分泌针对人源诺如病毒S (GI/GII) 区衣壳蛋白抗体的阳性细胞株,其特征在于,所述阳性细胞株为一种杂交瘤细胞株,保藏编号为CCTCC C201938。

一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒及细胞株

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学与免疫学领域,尤其涉及一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒及细胞株。

背景技术

[0002] 诺如病毒(noroviruses, NoVs), 曾称诺瓦克病毒(Norwalk virus)、类诺瓦克病毒(Norwalk-like virus)或小圆状病毒(small round structured virus, SRSV), 隶属于嵌杯科诺如病毒属成员, 为单股正链RNA病毒。1972年Kapikian等利用免疫电镜的方法在1968年美国俄亥俄州Norwalk镇暴发的急性冬季呕吐症样品中首次发现了该病毒, 并将其命名为Norwalk virus。此后陆续出现关于该病毒暴发的报道, 导致该病毒命名混乱。2002年, 国际病毒分类委员会(the International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 将其归为嵌杯状病毒科, 并正式更名为诺如病毒。

[0003] 根据病毒主要结构蛋白核酸序列的不同, NoVs被分为7个组(GI-GVII), 其中GI、GII和GIV组NoVs可以感染人类, 被称为人源诺如病毒(human noroviruses, HuNoVs)。流行病学数据表明: HuNoVs (GI和GII组为主) 是造成急性非细菌性胃肠炎的最主要元凶, 具有发病率高、感染剂量低、对外界抵抗力强等特点。美国疾控中心对该国的疫情监测结果表明, 2009-2010年间共暴发1527起食源性疾病事件, 其中790例疫情的病原体是HuNoVs, 占总暴发事件的42%。2012年底, 陆续在英国、荷兰、日本等国暴发了不同等级的HuNoVs流行事件。HuNoVs呈现出全世界范围频发且各地发病率出现逐年增高的趋势, 与人们对其认识的深入、检测方法日益发展完善、灵敏度显著提高有关。

[0004] 目前, HuNoVs的检测方法建立在病毒粒子外形、特异性核酸区段和主要抗原决定簇的基础上, 主要有电镜法、免疫学方法和分子检测方法等。中国发明专利CN201510487540.1、CN201510179138.7、CN201310553678.8、CN201310271924.0等都是用于NoVs的分子检测。但是, 这些发明专利和目前常用的HuNoVs检测方法的缺陷主要在于: 1) 均需要通过专门抽提RNA的步骤获得病毒核酸, 费时费力; 2) 无法区别扩增模板RNA来源于感染性的NoVs粒子, 还是样品中游离的病毒RNA; 3) 环境和食品样本中通常含有一些PCR抑制剂, 容易造成假阳性结果; 4) 仪器设备昂贵, 且对操作人员技能要求高。因此, 研发一种广谱、特异性好、操作简单、快速且便携的HuNoVs检测试剂盒具有良好的应用价值和推广前景。

[0005] 免疫学检测方法最为方便。该类方法需要以抗原获得特异性抗体, 建立检测体系并构建试剂盒。传统的抗体制备方法是: 以重组蛋白免疫实验动物制备抗体。一般的流程为: 先培养诱导表达重组菌, 通过标签纯化带标签的目的蛋白, 再以蛋白酶切除融合标签蛋白; 不带标签的重组蛋白根据蛋白质特性进行纯化; 若表达蛋白以包涵体形式存在, 则按照流程进行包涵体纯化。目前, 蛋白纯化需要综合运用各种手段, 且蛋白纯度和可溶性较低。制备抗体时, 需要用纯化的蛋白免疫实验动物, 最后再用亲和配体来纯化抗体。这样的抗体制备程序较为繁琐, 抗体成本高, 不适合大规模工业生产; 另外, 每多一步操作, 蛋白量至少

有20%的损失,蛋白免疫学活性约30%的损失。如果抗原蛋白以包涵体形式进行表达,则更难以进行蛋白的纯化。由于菌体含有多种蛋白,任何纯化方法均难免遇到结构或性质与目的蛋白相似的菌体蛋白,而且在纯化过程中很难清除这类蛋白,从而导致抗原蛋白纯度较低。以纯度较低的抗原蛋白进行实验动物的免疫,并以该蛋白作为亲和配体纯化抗体,那么,所获得的抗体中必然混有非针对抗原蛋白的杂抗体。如果以这种抗体构建试剂盒来检测标本,其检测结果的可信度会很低。

[0006] 因此,本领域的技术人员致力于开发一种工艺简单、特异性好、纯化简便、蛋白免疫学活性损失少且操作简便的人源诺如病毒主要衣壳蛋白S区蛋白抗体制备方法,以及相应的单克隆抗体及细胞株,并构建一种胶体金检测试剂盒,能够快速、简便、高效、检测谱广且更加安全地检测人源诺如病毒标本。

发明内容

[0007] 有鉴于现有技术的上述缺陷,本发明所要解决的技术问题是如何提供一种工艺简单、特异性好、纯化简便、蛋白免疫学活性损失少且操作简便的人源诺如病毒主要衣壳蛋白S区蛋白抗体制备方法,以及相应的单克隆抗体及细胞株,并构建一种胶体金检测试剂盒,能够快速、简便、高效、检测谱广且更加安全地检测人源诺如病毒标本。

[0008] 为实现上述目的,本发明提供了一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒,所述试剂盒包括固相载体、检测抗体和样品处理液,其中所述固相载体包括样品垫、胶体金结合垫、具有检测线和质控线的承载膜、吸收垫及底板,所述胶体金结合垫包括结合垫本体和涂覆于所述结合垫本体上的胶体金标记抗体涂层,所述检测线为能够与所述胶体金标记抗体特异性结合的配对抗体形成的涂层,所述检测线位于所述承载膜的靠近所述胶体金结合垫一端,所述质控线位于所述承载膜的靠近所述吸收垫一端。

[0009] 进一步地,所述胶体金结合垫和所述检测线使用的抗体为人源诺如病毒S (GI/GII) 区衣壳蛋白的单克隆抗体;所述质控线为羊抗鼠二抗形成的涂层。

[0010] 进一步地,所述承载膜采用NC膜,所述底板采用PVC材料。

[0011] 进一步地,所述样品处理液包括PBS溶液和DTT溶液,其中所述PBS溶液的pH值为9,所述DTT溶液的浓度为10.0% (w/v)。

[0012] 进一步地,所述试剂盒中所述固相载体和所述检测抗体的搭配组合可采用以下方式:(1) 纳米金颗粒标记的所述单克隆抗体与同种的所述单克隆抗体搭配;(2) 纳米金颗粒标记的所述单克隆抗体与对应的所述单克隆抗体中具有不同抗原表位的单克隆抗体搭配。

[0013] 进一步地,所述人源诺如病毒S (GI/GII) 区衣壳蛋白的单克隆抗体通过以下步骤制备:

[0014] 步骤一、扩增所述人源诺如病毒S (GI/GII) 区衣壳蛋白编码区基因,通过限制性内切酶在酶切位点酶切将其插入原核表达载体pET-28a,得到重组表达质粒pET28a-S (GI/GII),其中所述酶切位点为上游EcoR I,下游Xho I;

[0015] 步骤二、将所述步骤一中得到的所述重组表达质粒pET28a-S (GI/GII) 转化至大肠杆菌BL21,加入诱导剂诱导所述S (GI/GII) 区衣壳蛋白的表达,得到诱导后的重组细菌;

[0016] 步骤三、收集并破碎诱导后的所述重组细菌免疫实验动物;免疫后,适时融合所述免疫实验动物的脾细胞与骨髓瘤,以差异性ELISA法筛选杂交瘤细胞株,获得只分泌所述S

(GI/GII)区衣壳蛋白的特异性抗体的阳性细胞株,所述阳性细胞株通过普通培养法得到含有只针对所述S (GI/GII)区衣壳蛋白的单克隆抗体细胞上清液,或者将所述细胞株注入所述免疫实验动物腹腔内获得含有只针对所述S (GI/GII)区衣壳蛋白的所述单克隆抗体的腹水;

[0017] 步骤四、将所述步骤三中得到的含有所述单克隆抗体的细胞培养上清液或腹水进行纯化,得到纯化的所述人源诺如病毒S (GI/GII)区衣壳蛋白的单克隆抗体。

[0018] 进一步地,所述步骤一中还需引入上游扩增引物P1和下游扩增引物P2,针对所述人源诺如病毒S (GI)区衣壳蛋白的所述上游扩增引物和下游扩增引物的核酸序列分别为5' GAATTCATGATGATGGCGTCTAAG 3' 和5' CTCGAGCTCCACCGTAGGAGGGAC 3';针对所述人源诺如病毒S (G II)区衣壳蛋白的所述上游扩增引物和下游扩增引物的核酸序列分别为5' GAATTCATGAAGATGGCGTCGAGTG3' 和5' CTCGAGCTCAACTGTGGGTGGCAC3'。

[0019] 进一步地,所述差异性ELISA法筛选为含所述重组表达质粒pET28a-S (GI/GII)和空的所述原核表达载体pET-28a的所述诱导后的重组细菌的裂解物包被固相载体,分别与待筛选的单克隆抗体细胞株所分泌的抗体进行反应,只与含所述重组表达质粒pET28a-S (GI/GII)的所述诱导后的重组细菌的裂解物反应,而不与空的所述原核表达载体pET-28a的所述诱导后的重组细菌的裂解物反应的细胞株定为阳性,从而获得分泌针对不同基因型诺如病毒S区衣壳蛋白抗体的阳性细胞株。

[0020] 本发明还提供了一种只分泌针对人源诺如病毒S (GI/GII)区衣壳蛋白抗体的阳性细胞株,所述阳性细胞株为一种杂交瘤细胞株,保藏编号为CCTCC C2018185。

[0021] 本发明还提供了一种只分泌针对人源诺如病毒S (GI/GII)区衣壳蛋白抗体的阳性细胞株,所述阳性细胞株为一种杂交瘤细胞株,保藏编号为CCTCC C201938。

[0022] 与现有技术相比,本发明至少具有以下有益的技术效果:

[0023] (1) 本发明方法中采用经(或未经)初步纯化的重组S蛋白(不需要纯度很高也不需要切载体蛋白34个氨基酸残基)直接免疫动物而不用pET28a-S (GI/GII)细菌诱导后裂解物可以适当提高免疫原中有效成分的相对含量,尽可能激发多的B淋巴细胞,产生更多的S蛋白抗体,从而提高抗体的产量或者单抗阳性细胞株筛选的概率,大幅地降低了工艺难度和生产成本;

[0024] (2) 所用的重组S蛋白初步纯化流程对于目标蛋白的量及免疫学活性损失少,且简单易行,仪器设备要求低;

[0025] (3) 本发明制备的单克隆抗体和多克隆抗体特异性好,检测试剂盒具有抗干扰性强、生产成本低、检测目标广的优点。

[0026] 以下将结合附图对本发明的构思、具体结构及产生的技术效果作进一步说明,以充分地了解本发明的目的、特征和效果。

附图说明

[0027] 图1是本发明的一个较佳实施例的胶体金试剂盒固相载体结构示意图,其中1-样品垫,2-胶体金结合垫,21-结合垫本体,22-胶体金标记抗体涂层,3-承载膜,4-底板,5-吸收垫,6-检测线(T线),7-质控线(C线);

[0028] 图2是本发明的一个较佳实施例使用的蛋白表达载体pET-28a图谱;

- [0029] 图3是本发明的一个较佳实施例构建的重组表达质粒pET28a-S (GI/GII) 示意图；
- [0030] 图4是本发明的一个较佳实施例以RT-PCR方法从临床腹泻样本中扩增出的人源诺如病毒S区衣壳蛋白基因编码区片段(质量百分比1%琼脂糖凝胶电泳图)；
- [0031] 图5是本发明的一个较佳实施例含重组表达质粒pET28a-S (GI/GII) 的大肠杆菌BL21 (DE3) 经0.5mM IPTG不同诱导时长目的蛋白表达量对比SDS-PAGE电泳图,其中M为蛋白质Marker,从上到下依次分别为97kD,66kD,43kD,31kD,20kD,14.4kD;泳道1,2,3,4,5,6,7,8,9分别代表诱导前,诱导1小时,2小时,3小时,4小时,5小时,6小时,7小时,8小时,SDS-PAGE分离胶浓度为10%；
- [0032] 图6是本发明的一个较佳实施例纯化后的S蛋白电泳图,其中M为蛋白质Marker,从上到下依次分别为97kD,66kD,43kD,31kD,20kD,14.4kD,SDS-PAGE分离胶浓度为10%。

具体实施方式

[0033] 以下参考说明书附图介绍本发明的多个优选实施例,使其技术内容更加清楚和便于理解。本发明可以通过许多不同形式的实施例来得以体现,本发明的保护范围并非仅限于文中提到的实施例。

[0034] 实施例1不同基因型重组人源诺如病毒S区衣壳蛋白重组表达与纯化

[0035] 1.S蛋白编码基因的获取

[0036] 根据GenBank已经收录的基因(NCBI登录号:KM114291和KF429765),应用Primer premier 5.0软件设计一对引物,并在上游和下游引物5'端分别加入EcoR I和Xho I限制酶切位点,S蛋白编码基因通过酶切位点插入表达载体pET-28a(如图2所示),所表达的融合蛋白上含有载体的6个His标签蛋白,便于后续纯化(构建后的重组质粒示意图如图3所示),设计引物如下:

[0037] 人源诺如病毒GI.1衣壳蛋白S区扩增引物:

[0038] 上游引物(P1):5' GAATTCATGATGATGGCGTCTAAG 3'

[0039] 下游引物(P2):5' CTCGAGCTCCACCGTAGGAGGGAC 3'

[0040] 人源诺如病毒GII.4衣壳蛋白S区扩增引物:

[0041] 上游引物(P1):5' GAATTCATGAAGATGGCGTCGAGTG3'

[0042] 下游引物(P2):5' CTCGAGCTCAACTGTGGGTGGCAC 3'

[0043] 以HuNoV GI.1和GII.4基因组RNA为模板,分别利用上述引物反转录扩增S结构域蛋白编码基因。

[0044] 反转录反应体系为:10×RT Buffer 1.00μL,Mg²⁺(25mmol/L) 2.00μL,dNTPs(10mmol/L) 1.00μL,RNase Inhibitor(50mmol/L) 0.25μL,AMV Reverse Transcriptase(5U/L) 0.50μL,Oligo dT(2.5mmol/L) 0.50μL,RNase Free ddH₂O 3.75μL,模板1.00μL。

[0045] 反转录反应条件及过程为:42℃,30min;95℃,5min;5℃,5min。

[0046] PCR反应体系为:5×PCR Buffer 10.00μL,TaKaRa Ex Taq HS(5U/μL) 0.25μL,上游引物(10mmol/L) 0.50μL,下游引物(10mmol/L) 0.50μL,反转录产物10.00μL,ddH₂O 28.75μL。

[0047] PCR反应条件及过程为:94℃,5min后进入32个循环。循环参数为:94℃,30s;55℃,30s;72℃,2min。72℃延伸10min。

[0048] 利用1%的琼脂糖凝胶电泳对10 μ L扩增产物进行检测,检测结果如图4所示。

[0049] 利用普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒 (Axygen, AP-GX-50) 从凝胶中回收目的DNA片段(操作参照产品说明书进行)。

[0050] 2. 大肠杆菌DH5 α 和BL21 (DE3) 感受态的制备

[0051] 在pET28a-S (GI/GII) 构建和S蛋白诱导表达的过程中,需要用到大肠杆菌DH5 α 和BL21 (DE3)。

[0052] 大肠杆菌DH5 α /BL21 (DE3) 感受态(氯化钙法)的制备方法如下:挑取DH5 α /BL21 (DE3) 菌株在LB平板上划线培养;37 $^{\circ}$ C培养后,挑取单菌落至3mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 200r/min培养过夜;将上述培养液按1%接种量接种到50mL LB液体培养基中37 $^{\circ}$ C 200r/min振荡培养2-3小时(OD_{600} =0.3-0.4);将菌液置冰浴10min,转移到无菌的50mL离心管中,4 $^{\circ}$ C 4000r/min离心10min,弃上清,加入20mL无菌的冰预冷的0.1mol/L $CaCl_2$ 溶液悬浮菌体;4 $^{\circ}$ C 4000r/min离心10min,弃上清;再加入2mL无菌的冰预冷的0.1mol/L $CaCl_2$ 溶液重新悬浮菌体。混合物即为感受态细胞,可直接用于转化试验。

[0053] 3. 重组质粒pET28a-S (GI/GII) 的构建

[0054] 将回收的DNA片断与原核表达载体pET-28a分别用EcoR I和Xho I限制酶进行酶切,酶切后分别回收DNA片断,按照pET-28a载体:DNA片断数量=1:3-8的比例混合,加入T₄DNA连接酶,22 $^{\circ}$ C过夜;连接产物用于转化大肠杆菌DH5 α 感受态,转化后涂布于LB平板,37 $^{\circ}$ C培养过夜。

[0055] 挑取平板上的单菌落扩大培养至3mL培养瓶中,收集菌液提取质粒,通过双酶切进行鉴定(鉴定标准:酶切之后电泳显示为两条清晰的条带,大小分别为约5.2kb和0.6kb),鉴定正确的质粒即为重组表达质粒pET28a-S (GII/GI)。将鉴定正确的质粒进行核酸序列测序分析,确认克隆基因开放阅读框未发生移码突变和终止突变。

[0056] 4. 重组质粒pET28a-S (GI/GII) 的诱导表达及表达条件的优化。

[0057] 测序正确的重组表达质粒pET28a-S (GI/GII) 转化BL21 (DE3) 感受态细胞,挑取单菌落,接种于100mL LB(含100 μ g/mL卡那霉素),37 $^{\circ}$ C 200rpm培养至 OD_{600} =0.4-0.5,加入终浓度为1.0mM的IPTG进行目的蛋白的诱导表达。每隔1小时取1.0mL诱导样品,将以上每次所取样品连同诱导前的样品,10,000g离心2min收集菌体即为诱导后菌体。将样品以0.5mL双蒸水进行菌体重悬,加入2 $\times$ SDS-PAGE上样缓冲液,沸水浴10min后,冰浴2min;10,000g离心2min,取上清液进行10%SDS-PAGE电泳,通过不同诱导时间的S蛋白表达量进行比对,得到S蛋白最佳诱导时间为5-8小时,不同时长蛋白表达量的电泳结果图5所示。

[0058] 5. 重组S蛋白的初纯化

[0059] 按照上述优化条件诱导含重组质粒pET28a-S (GI/GII) 宿主菌的表达,收集菌体并通过超声波破碎,离心后上清液通过镍亲和层析琼脂糖凝胶(GE healthcare, 17-5318-01)进行纯化(操作方法参照产品使用手册),得到初纯化的S蛋白,所有步骤参照产品使用手册严格执行,纯化后得到的蛋白经10%SDS-PAGE分析纯度,纯化后的S蛋白电泳结果如图6所示,SDS-PAGE胶上有很少量的蛋白杂带。

[0060] 实施例2重组S蛋白单克隆抗体的制备

[0061] 将初纯化的S蛋白进行动物免疫及免疫效果检测,方法如下:

[0062] 选择适龄的健康雌性动物进行免疫,B1ab/C小鼠的首次免疫剂量为50 μ g~200 μ g/

次,采用多点皮下注射的免疫方式,每间隔3周,进行加强免疫,免疫剂量为首免的一半,每次免疫前尾静脉取血检测抗体效价,直到血清中抗体ELISA效价达到 $1:10^6$ 以上。免疫佐剂:首免用弗氏完全佐剂,以后用弗氏不完全佐剂,每次免疫前将抗原与佐剂按照同体积混合后通过乳化。本实施例以Balb/C小鼠制备单克隆抗体。

[0063] 1. 抗体效价的检测

[0064] Balb/C小鼠按上述动物免疫流程进行免疫,每次免疫前采集血清进行效价测定。重组S蛋白以包被液稀释到 $1.0\mu\text{g/mL}$, $100\mu\text{L/孔}$,包被于96孔酶标板中, 4°C 过夜;弃液, $150\mu\text{L/孔}$ 加入封闭液(含1%牛血清白蛋白的 0.01mol/L TBS, pH 8.5), 37°C 封闭1小时;用TBST(含0.05% Tween-20)洗板后,待检血清从1:1,000起进行倍比稀释; $100\mu\text{L/孔}$ 加入酶标板, 37°C 孵育30min;用TBST洗板3次后,以 $100\mu\text{L/孔}$ 加入HRP标记羊抗鼠(1:3,000稀释,福因德科技(武汉)有限公司生产); 37°C 孵育45min后,TBST洗板5次后,加入显色液(3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),福因德科技(武汉)有限公司生产),避光室温反应10分钟,每孔加 $50\mu\text{L}$ 显色终止液(2mol/L H_2SO_4)终止反应,读取450nm吸光值(OD_{450})。待检血清某个稀释度的450nm吸光值为空白对照3倍时,该稀释度定义为该抗体的ELISA效价。

[0065] 2. 单克隆抗体制备

[0066] Balb/C小鼠的免疫流程按上述动物免疫方法进行。首免和再免后分别采用断尾抽真空法采血20-40 μL 进行抗体检测,三免后两周进行一次加强免疫,三天后进行细胞融合。

[0067] ①瘤细胞的准备:融合前一周复苏SP2/0骨髓瘤细胞并培养,在融合前天将细胞调整到合适浓度,融合是细胞处于80%长满,大小均匀透亮为宜。

[0068] ②饲养细胞和免疫脾细胞的制备:制备饲养细胞,采用Balb/C小鼠的腹腔巨噬细胞和脾细胞的混合细胞作为饲养细胞,其制备步骤如下:

[0069] 脱颈椎处死空白Balb/C小鼠1只,用75%(体积比)的酒精浸泡5min。在无菌超净台上仰面固定小鼠,剪开腹部皮毛并固定至两侧,露出胸腹;提起腹膜,注射器针头刺破腹膜注入2.5mLRPMI-1640基础培养液,反复吹吸多次,最后将腹腔液体吸回注射器,4000rpm离心5分钟,RPMI-1640基础培养液重悬即为腹腔巨噬细胞。打开腹腔,取出脾脏,匀浆器加5mLRPMI-1640基础培养液研磨脾脏至均匀糊状,稍微静置吸取上部细胞悬液装入离心管;加入10mL RPMI-1640基础培养液,4000rpm离心5分钟,如此重复洗涤3次。

[0070] 免疫脾细胞的制备:免疫脾细胞的制备与饲养细胞制备流程完全相同。

[0071] ③细胞融合:将免疫脾细胞和SP 2/0骨髓瘤细胞按照1:3-8的数量比混合摇匀,4000rpm离心5分钟,倒掉上清;在振荡器上震荡2分钟,细胞混合物变成粘稠糊状之后,缓慢均匀的加入1mL的融合剂(50%PEG1450),边加边搅动使细胞糊状始终保持均匀,无块状团状;1分钟内加完并静置90秒,立即用50mL RPMI-1640基础培养液均匀稀释,边加边搅动,始终保证细胞糊均匀;加完后,离心再加入50mLRPMI-1640基础培养液离心洗涤两次。

[0072] 融合后的细胞与适量的饲养细胞混合,用含质量体积比1% HAT的RPMI-1640完全培养液(含10%胎牛血清)将其分种于96孔细胞培养板,每孔 $100\mu\text{L}$, CO_2 培养箱(CO_2 浓度为5%) 37°C 培养4-7天后,观察培养板孔中细胞集落,第7天补加 $100\mu\text{L}$ 含质量体积比1% HT的RPMI-1640完全培养液继续培养。细胞液变黄时,进行抗体检测。

[0073] ④分泌目标抗体细胞株的筛选

[0074] 以差异性ELISA筛选方法对有杂交瘤细胞培养孔中的抗体进行筛选:含重组质粒

pET28a-S (GI/GII) 与空载体质粒pET-28a的诱导后菌体裂解物分别包被固相载体;通过间接ELISA法,筛选与含重组质粒pET28a-S (GI/GII) 裂解物包被板孔反应,而不与空载体质粒pET-28a的诱导裂解物包被板孔反应的细胞孔,确定为阳性孔,步骤如下:

[0075] A. 包被:含重组质粒pET28a-S (GI/GII) 与空载体质粒pET-28a的100 μ L诱导裂解物分别作为包被物,以1.0mg/mL的浓度包被酶标板过夜(以下分别简称pET28a-S (GI/GII) 孔和pET-28a孔);

[0076] B. 封闭:倒掉剩余包被物,甩干酶标板,向酶标板内加入150 μ L封闭液(含质量体积比1%BSA的0.01mmol/L TBS pH8.5),37 $^{\circ}$ C封闭1小时;每孔200 μ L加入洗涤液,洗涤3次。

[0077] C. 加培养上清:仅对有集落的孔的培养上清进行检测,每孔取样100 μ L,分别加到pET28a-S (GI/GII) 孔和pET-28a孔内,37 $^{\circ}$ C温箱放置0.5h后,洗板3次。同时设阴性血清和阳性血清对照(1:5000加样)。

[0078] D. 加HRP标记羊抗鼠IgG:工作浓度1:5000,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C温箱放置30min后,洗板5次。

[0079] E. 加入显色液(3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),福因德科技(武汉)有限公司生产),避光室温反应10分钟,每孔加50 μ L显色终止液(2mol/L H₂SO₄)终止反应,测定450nm吸光值(OD₄₅₀)。

[0080] F. 结果判定:根据同一样品ODpET28a-S (GI/GII) 孔/ODpET-28a孔来加以判断,选择OD pET28a-S (GI/GII) 孔/OD pET-28a孔值最大的3-5孔通过有限稀释法再次克隆,选取只有单个克隆的细胞孔重复以上的ELISA筛选步骤,得到可稳定分泌针对S蛋白抗体的阳性细胞株(即杂交瘤细胞株2C4,保藏编号为CCTCC C2018185,保藏日期为2018年8月31日),采用间接ELISA法鉴定分泌的抗体亚型为IgG2a型。抗体亚型的鉴定参经常规通用的间接ELISA法方法进行,本实施例不做赘述。

[0081] 同样筛选得到可稳定分泌针对S蛋白抗体的阳性细胞株(即杂交瘤细胞株3E6,保藏编号为CCTCC C201938,保藏日期为2019年5月20日)。

[0082] 两种杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体可针对识别不同抗原表位。

[0083] ⑤小鼠腹水法生产单克隆抗体

[0084] 本实施例以灭菌液体石蜡预处理Balb/C小鼠后,再注射杂交瘤细胞的方法生产腹水,其具体过程如下:

[0085] 用灭菌的液体石蜡腹腔注射Balb/C小鼠(0.5mL/只)。十天后,腹腔注射杂交瘤细胞0.5mL/只($1-5 \times 10^6$ 个/毫升),每天观察小鼠腹部;当小鼠腹部隆起(约8天),即可采集腹水(含有针对S蛋白的单克隆抗体的腹水)。

[0086] ⑥培养细胞法生产单克隆抗体

[0087] 按照常规细胞培养法进行,本实施例不做赘述。

[0088] 实施例3单克隆抗体的纯化

[0089] 单克隆抗体的纯化按照以下步骤进行:

[0090] A. 以二氧化硅吸附法对腹水进行预处理:

[0091] 取腹水,加等体积的巴比妥缓冲液和适量二氧化硅粉末;室温下,搅拌30min;1800r/min,离心20min,即得澄清的腹水。

[0092] B. 用50%的饱和硫酸铵粗提1次,33%的饱和硫酸铵粗提2次;以1/2腹水体积的

PBS溶解单抗并装入透析袋,用PBS透析两天;分装后冻干,-20℃保存。使用时,以蒸馏水溶解,再加等体积甘油,混匀后,-20℃保存。

[0093] C.葡聚糖凝胶G200纯化单抗:将葡聚糖凝胶G200装柱,取1mL粗提的单抗上柱,用PBS洗脱;以20%磺基水杨酸检测洗脱液,出现白色浑浊后开始收集。分装冻干,-20℃保存。使用时,以蒸馏水溶解,再加等体积甘油,混匀后,-20℃保存。

[0094] 最终,获得重组人源诺如病毒主要衣壳蛋白S区的单克隆抗体。

[0095] 实施例4广谱人源诺如病毒胶体金试剂盒的构建

[0096] 本实施例采用单克隆抗体(包被抗体)对应识别不同抗原表位的单克隆抗体(检测抗体)为例来进行说明广谱人源诺如病毒胶体金试剂盒的构建。

[0097] 如图1的结构示意图所示,所述广谱人源诺如病毒胶体金试剂盒包括固相载体、检测抗体和样品处理液,其中所述固相载体包括样品垫1、胶体金结合垫2、具有检测线6和质控线7的承载膜3、吸收垫5及底板4,所述胶体金结合垫2包括结合垫本体21和涂覆于所述结合垫本体21上的胶体金标记抗体涂层22,所述检测线6为能够与所述胶体金标记抗体特异性结合的配对抗体形成的涂层,所述检测线6位于所述承载膜3的靠近所述胶体金结合垫2一端,所述质控线7位于所述承载膜3的靠近所述吸收垫5一端。所述胶体金标记抗体涂层22与所述检测线采用人源诺如病毒的具有不同抗原表位识别位点的单克隆抗体,所述质控线7使用羊抗鼠二抗形成的涂层。所述承载膜3采用NC膜,所述底板4采用PVC材料制作底板。

[0098] 包被抗体涂层:将纯化得到的单克隆特异性抗体划线载体,包被方法:抗体经包被液(pH9.6)稀释到1μg/mL,100μL/孔,包被于96孔酶标板中,4℃过夜;150μL/孔加入封闭液(含质量体积比1%BSA的0.01mmol/L TBS pH8.5),37℃封闭1小时;排干后孔中液体,自然晾干,铝箔袋真空密封包装,-20℃保存,装盒备用。

[0099] 标准品的制备:纯化的人源诺如病毒主要衣壳蛋白

[0100] 测定浓度后分装成1.0μg/支,真空冻干,备用。

[0101] 检测抗体的制备:将纯化得到的单克隆特异性抗体标记生物素,制备成检测抗体(标记方法参照Sigma B2643产品说明书)。

[0102] 样品处理试剂制备:滴加0.2M K₂CO₃调节PBS溶液pH=9,室温保存;取0.10g DTT至1ml去离子水中混匀,配制10.0%(w/v)DTT,现用现配。

[0103] 样品稀释液:含1%BSA(质量体积比),0.01mmol/L TBS pH8.5。

[0104] 检测抗体稀释液:含1%BSA(质量体积比),1%PEG4000(质量体积比)0.01mmol/L TBS pH8.5。

[0105] 浓洗涤液:0.25mmol/L TBS pH8.5。

[0106] 试剂盒组装:本试剂盒包括固相载体(包被有抗体:单克隆特异性抗体的96孔酶标板)1块、标准品(纯化的人源诺如病毒主要衣壳蛋白的冻干品,1.0μg/支,临用前用去离子水稀释到1毫升,然后样品稀释液作连续倍比稀释)2支、检测抗体(生物素标记的单克隆特异性抗体120μL,临用前用检测抗体稀释液稀释100倍即为检测抗体工作液)1支,链霉亲和素酶标记复合物(120μL,武汉伊艾博科技有限公司生产,临用前用检测抗体稀释液稀释100倍即为链霉亲和素酶标记复合物工作液)1支,即用型3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液(12mL,武汉伊艾博科技有限公司生产)1支,显色终止液(10mL 2M H₂SO₄)1支,样品稀释液(20ml)1支,检测抗体稀释液(10ml)1支,浓洗涤液(30ml,使用时每瓶用蒸馏水稀释25倍)1

瓶,酶标板覆膜5张,使用说明书1份。

[0107] 实施例5人源诺如病毒主要衣壳蛋白的检测

[0108] 将纯化的人源诺如病毒主要衣壳蛋白通过双抗体夹心法ELISA试剂盒检测含量,计算回收率(结果见表1)。

[0109] 检测前,各试剂均应平衡至室温,试剂不能直接在37℃溶解;试剂或样品配制时,均需充分混匀,混匀时尽量避免起泡。实验前应预测样品含量,如样品浓度过高时,应对样品进行稀释,以使稀释后的样品符合试剂盒的检测范围,计算时再乘以相应的稀释倍数。

[0110] 夹心法ELISA试剂盒操作按照如下程序进行:

[0111] 1、检测样品预处理:取0.10g/ml腹泻样本至1.0ml PBS (pH=9),涡旋振荡配成10.0% (w/v) 的溶液;取90.0μl样本上清液,加10.0% (w/v) DTT 10.0μl至终浓度1.0%,混匀;等待10min后,取50.0μl滴加到反应窗中,等待10min,备用;

[0112] 2、加样:分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液100μL,标准孔加稀释好的标准品100μL/孔,待测样品孔加待测样品100μL/孔,注意不要有气泡,加样时将样品加于酶标板底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀,酶标板加上盖或覆膜,37℃温育2小时。弃去液体,甩干,不用洗涤。每孔加检测抗体工作液100μL(临用前配制),酶标板加上覆膜,37℃温育1小时。

[0113] 3、弃去液体,甩干,洗板5次,每次浸泡1-2分钟。每孔加链霉亲和素酶标记复合物工作液100μL,酶标板加上覆膜,37℃温育1小时。

[0114] 4、弃去孔内液体,甩干,洗板5次,每次浸泡1-2分钟,大约200μL/每孔,甩干(也可轻拍将孔内液体拍干)。

[0115] 5、每孔加3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液100μL,酶标板加上覆膜37℃避光显色(反应时间控制在15-30分钟,当标准孔的前3-4孔有明显的梯度蓝色,后3-4孔梯度不明显时,即可终止)。

[0116] 6、每孔加显色终止溶液50μL,终止反应,此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与显色液的加入顺序相同。

[0117] 7、立即用酶标仪在450nm波长测量各孔的光密度值(OD₄₅₀值)。

[0118] 表1. 利用ELISA试剂盒检测人空白血清中人源诺如病毒主要衣壳蛋白的回收率

[0119]

空白血清中添加人源诺如病毒 主要衣壳蛋白浓度 (ng/mL)	夹心法 ELISA 试剂盒 检测的结果 (ng/mL)	夹心法 ELISA 试 剂盒回收率 (%)
5.000	4.975	99.5
2.500	2.511	100.4
1.250	1.275	98.3
0.613	0.600	97.9
0.307	0.308	100.4
0.154	0.143	92.8
0.077	0.080	103.9
0	0.004	0

[0120] 通过表中数据可看出本发明提出的方法制备的试剂盒在样品检测中具有极高的回收率,相较于现有技术具有显著的进步。

[0121] 实施例6亲和层析纯化重组人源诺如病毒主要衣壳S蛋白的收集量

[0122] 按常规方法培养并诱导50毫升pET28-S (GI/GII) 表达菌,诱导后收集菌体,用于裂解后亲和纯化,洗脱后用凝血酶因子除载体上34氨基酸残基标签,再次通过镍亲和层析柱清除切割下来的标签蛋白,每步操作留样并记录总体积,用以上双抗体夹心法ELISA测量每步样品中蛋白含量,测量方法参照以上双抗体夹心法ELISA方法。直接裂解菌体液记作A液,亲和纯化洗脱下来的带标签的S (GI/GII) 蛋白液记作B液,切除载体标签蛋白后的S (GI/GII) 蛋白液记作C液,结果见表2。

[0123] 表2普通亲和层析过程蛋白质回收率表

[0124]

	总体积 (mL)	稀释倍数	测量值 (ng/mL)	总蛋白含量 (mg)	回收率 (%)
A 液	17.65	50000	8.15	7.56	/
B 液	7.55	150000	5.31	6.29	83.2
C 液	5.15	160000	5.96	5.26	83.6
总回收率					69.6

[0125] 以上所测量出来的蛋白含量为有免疫学活性的S (GI/GII) 蛋白,带34氨基酸残基标签的质量并未计算在此之内。

[0126] 通过表2中的数据可以看出以上试剂盒检测菌体纯化过程中S (GI/GII) 蛋白总量的变化,证明了蛋白纯化的过程中每多一步就会约有20%的损失。

[0127] 实施例7蛋白免疫学活性分析

[0128] 将B液和C液通过分光光度计测量S (GI/GII) 蛋白含量(包括有免疫学活性的和无免疫学活性的),C液调整到浓度为1.0mg/mL,B液调整到1.2mg/mL(B液中蛋白含有载体34氨基酸残基标签,因此在分光光度计测量时也被计算在内,实际S (GI/GII) 蛋白含量/带标签S (GI/GII) 蛋白含量=1.2),稀释 1.2×10^5 倍,通过双抗体夹心ELISA试剂盒测量S (GI/GII) 蛋白含量,结果如表3。

[0129] 表3双抗体夹心ELISA分析B液和C液中具有免疫学活性S (GI/GII) 蛋白含量

[0130]

	总蛋白浓度	S(GI/GII)蛋白浓度	有免疫学活性 S(GI/GII)蛋白
B 液	1.20mg/mL	1.00mg/mL	0.63 mg/mL
C 液	1.00mg/mL	1.00mg/mL	0.49 mg/mL
切除载体标签纯化操作过程造成活性损失率			22.2%

[0131] 从表3中试剂盒检测的数据可看出,在切标签过程中会有22.2%的S (GI/GII) 蛋白会失去免疫学活性。

[0132] 通过以上实施例及具体检测数据可以看出,本发明提供的一种人源诺如病毒主要衣壳蛋白S区蛋白抗体的制备方法可以简便、快速地制备出特异性好、免疫学活性损失少、且纯化度高地蛋白抗体,且可以直接采用初步纯化、甚至未纯化地重组蛋白即可通过免疫动物获得大量地蛋白抗体,大幅提高了产量、降低了工艺难度和生产成本。

[0133] 且采用本发明提供地方法制备的识别不同抗原表位的单克隆抗体组装的检测试

剂盒,不仅操作简便,且抗干扰性强、精度高,生产成本低,可以用于光谱检测。另外S区衣壳蛋白的结构特点决定了检测前需要对样品进行预处理,降低了检测人员在检测过程中的感染可能性,安全性更高。

[0134] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解,本领域的普通技术无需创造性劳动就可以根据本发明的构思做出诸多修改和变化。因此,凡本技术领域技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术方案,皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。

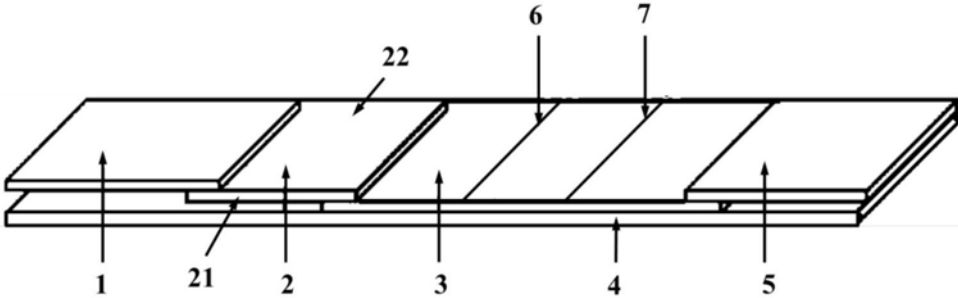


图1

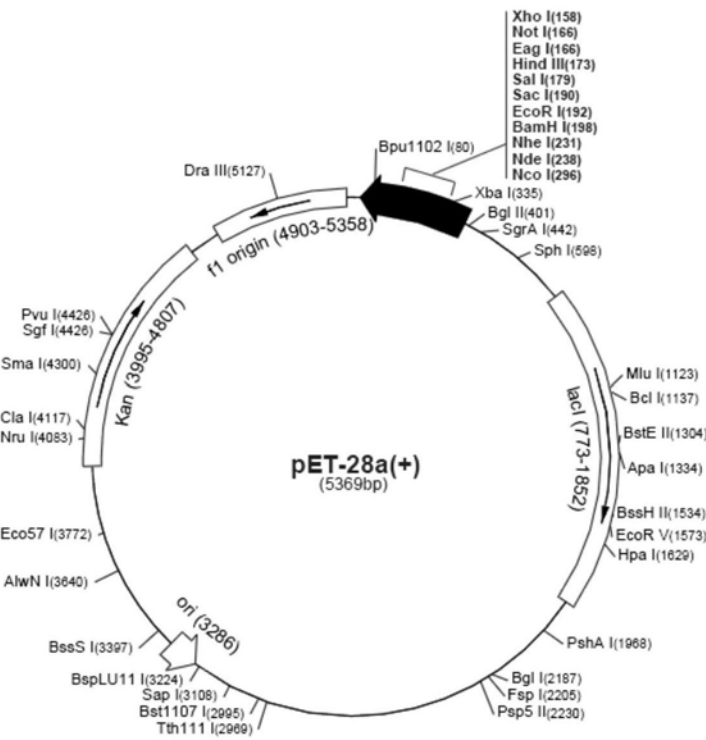


图2

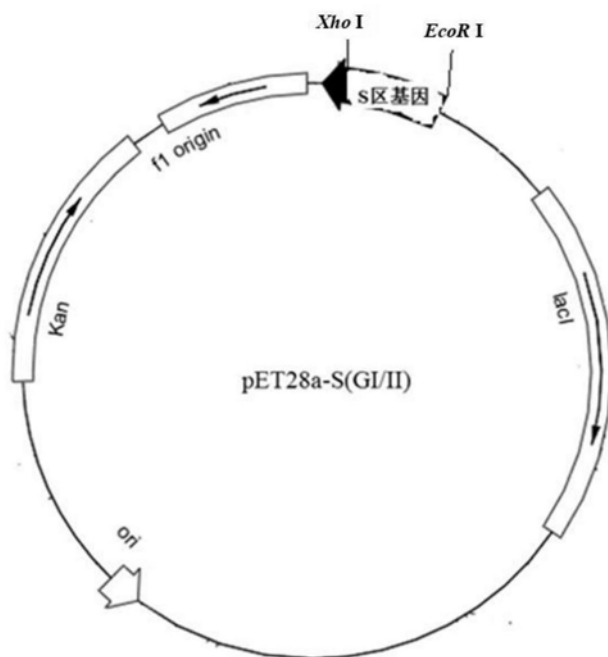


图3

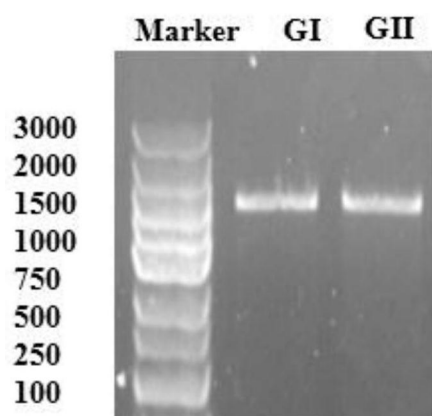


图4

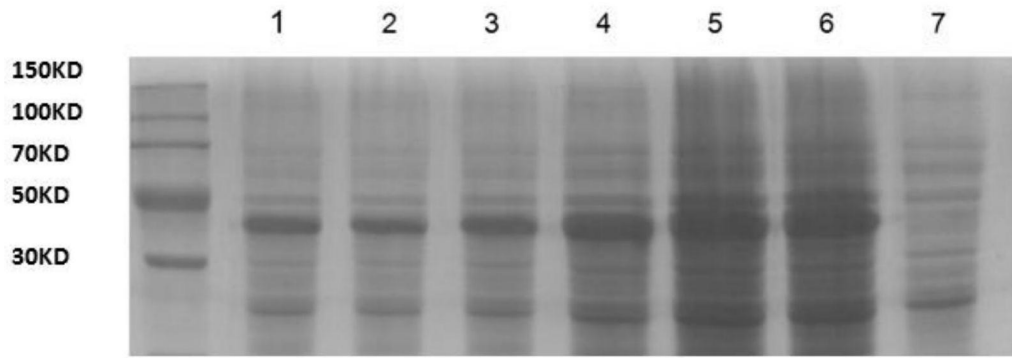


图5

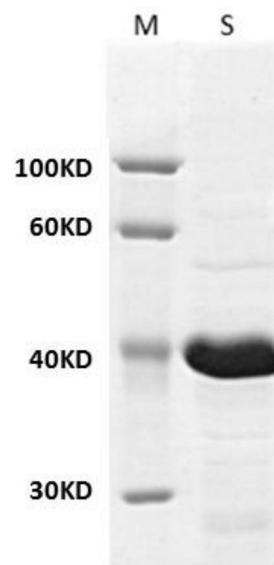


图6

专利名称(译)	一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒及细胞株		
公开(公告)号	CN110221080A	公开(公告)日	2019-09-10
申请号	CN201910555785.1	申请日	2019-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	王大鹏		
发明人	王大鹏		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/531 C12N5/20 C07K16/10 C12N15/40 C12N15/70 C12R1/91		
CPC分类号	C07K14/005 C07K16/10 C12N15/70 C12N2770/16022 G01N33/531 G01N33/54306 G01N33/558 G01N33/56983 G01N33/577 G01N33/6854		
代理人(译)	郑立		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人源诺如病毒免疫胶体金试剂盒，涉及分子生物学与免疫学领域，包括固相载体、检测抗体和样品处理液，其中固相载体包括样品垫、胶体金结合垫、具有检测线和质控线的承载膜、吸收垫及底板，胶体金结合垫包括结合垫本体和涂覆于结合垫本体上的胶体金标记抗体涂层；本发明还公开了相应的特异性细胞株。本发明通过人源诺如病毒S区衣壳蛋白抗体的制备，解决了现有技术制备工艺复杂、蛋白免疫学活性损失达、特异性差等问题，获得的单克隆抗体构建了人源诺如病毒的免疫胶体金检测体系，具有快速、简便、高效、检测谱广且更加安全的优点。

