



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111303276 B

(45) 授权公告日 2021.08.06

(21) 申请号 201911327145.1

(22) 申请日 2019.12.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111303276 A

(43) 申请公布日 2020.06.19

(83) 生物保藏信息
CGMCC No.18316 2019.08.15

(73) 专利权人 吉林大学
地址 130000 吉林省长春市前进大街2699号

(72) 发明人 刘明远 刘晓雷 刘琰 杨勇
唐斌

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 刘颖

(51) Int.Cl.

C07K 14/81 (2006.01)

C07K 16/38 (2006.01)

C12N 15/15 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 33/10 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

审查员 杨振宇

权利要求书1页 说明书11页
序列表3页 附图5页

(54) 发明名称

旋毛虫肠道期半胱氨酸蛋白酶抑制剂的B细胞表位多肽、杂交瘤细胞株、单克隆抗体、应用

(57) 摘要

本发明涉及免疫学领域,特别涉及旋毛虫肠道期半胱氨酸蛋白酶抑制剂(Ts-WN10)的B细胞表位多肽、杂交瘤细胞株、单克隆抗体及其应用。本发明获得了可以分泌抗Ts-WN10蛋白特异性抗体的杂交瘤细胞株,并鉴定出其所分泌的单克隆抗体所识别的Ts-WN10蛋白特异性B细胞表位多肽,对旋毛虫病的诊断具有重要意义,对建立竞争ELISA和循环抗原的检测的夹心ELISA用于旋毛虫多宿主的检测及亚单位疫苗的研制具有重要的意义。

1. WN10蛋白的B细胞表位多肽,其特征在于,其具有:如SEQ ID No.1所示的氨基酸序列。
2. 编码如权利要求1所述的B细胞表位多肽的核苷酸,其特征在于,具有
 - (I)、如SEQ ID No.2所示的核苷酸序列;或
 - (II)、如SEQ ID No.2所示的核苷酸序列的互补核苷酸序列;或
 - (III)、与(I)或(II)的核苷酸序列编码相同蛋白质,但因遗传密码的简并性而与(I)或(II)的核苷酸序列不同的核苷酸序列。
3. 一种包含如权利要求2所述的核苷酸的重组表达载体。
4. 一种包含如权利要求2所述的核苷酸的重组菌株或细胞。
5. 如权利要求1所述的B细胞表位多肽在制备旋毛虫感染的检测试剂、检测试剂盒或预防旋毛虫感染的疫苗中的应用。
6. 杂交瘤细胞株,其特征在于,其保藏编号为CGMCC No.18316。
7. 单克隆抗体,其特征在于,选自:

通过保藏编号为CGMCC No.18316的杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体;或具有所述的单克隆抗体的抗原结合片段的单克隆抗体,其中所述片段保持特异性结合WN10蛋白或其变体的能力。
8. 如权利要求6所述的杂交瘤细胞株或如权利要求7所述的单克隆抗体在制备旋毛虫感染的检测试剂、检测试剂盒或预防旋毛虫感染的疫苗中的应用。
9. 用于旋毛虫感染的检测试剂或检测试剂盒,其特征在于,包括如权利要求6所述的杂交瘤细胞株或如权利要求7所述的单克隆抗体以及检测学上可接受的辅料。

旋毛虫肠道期半胱氨酸蛋白酶抑制剂的B细胞表位多肽、杂交瘤细胞株、单克隆抗体、应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学领域,特别涉及旋毛虫肠道期半胱氨酸蛋白酶抑制剂的B细胞表位多肽、杂交瘤细胞株、单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 旋毛虫病主要是由于宿主生食或半生食含有旋毛虫的肉类引发,猪肉是人类感染的主要来源。人旋毛虫病潜伏期平均为2周,急性期患者的主要症状为发烧、肌肉剧烈疼痛、严重的腹泻、面部水肿以及嗜酸性粒细胞增多等,症状可以持续数周并导致肌体衰竭,尤其重度感染者可出现心肌及大脑严重损伤,甚至死亡。

[0003] 鉴于旋毛虫对公共卫生安全造成的极大威胁与危害,世界动物卫生组织(OIE)将旋毛虫病列为屠宰动物强制性检验及首检必检病种。对于屠宰动物旋毛虫病的检验,国际动物卫生组织(OIE)的法规检验方法为镜检法及集样消化法,目前我国也在延用这两种方法。然而以上两方法均存在一定的弊端,镜检法费时费力而且敏感性差,其敏感性为肉中虫体密度达到每克3条虫体时方可检出。集样消化法虽可大大提高检出率,将虫体检出率提高至每克肉1条虫体,但该方法仍十分繁琐,在发现阳性样品时仍需对阳性组进行逐头检测。从敏感性的角度来看,由镜检法和集样消化法所造成漏检的肉类均存在安全隐患并可引起人类的感染(摄入75条虫体即可引起人的感染)。

[0004] 国内外学者对旋毛虫免疫学检测的方法进行了大量的研究,如间接荧光免疫试验,免疫酶染色试验,免疫印迹试验,免疫吸附试验(ELISA)等,酶联免疫吸附试验(ELISA)是进行旋毛虫感染检测的最常用的免疫学方法,其具有高的敏感性,检测底限可低至每100g肌肉组织中1条幼虫。目前,旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ES抗原是OIE及国际旋毛虫委员会规定的唯一的用于血清学抗体检测的标准抗原。然而ES抗原成分复杂,制备繁琐、生产周期长、批次质量不均,而且存在严重的诊断盲区(感染后19d前无法检出)和交叉反应等问题,因而阻碍了其实际应用。因此,筛选特异性及敏感性的旋毛虫抗原,利用基因工程技术制备重组抗原,以减小抗原制备难度,建立无盲区的特异性猪旋毛虫病血清学检测方法已成为国内外众多学者的研究焦点。现代分子生物学技术的发展和运用,筛选并大规模制备质量均匀、性能良好的旋毛虫病诊断抗原成为可能。

[0005] 本申请人对感染后6h的旋毛虫cDNA表达文库中进行了免疫学筛选,成功获得了一条高丰度强反应原性的抗原蛋白基因命名为WN10,编码半胱氨酸蛋白酶抑制剂。WN10基因注册号:EU263325,蛋白注册号:ABY60755。进一步免疫印记和间接ELISA表明原核表达的重组WN10抗原可以被猪感染旋毛虫后17天、25天和60天血清所识别,表明WN10是旋毛虫血清学检测的理想候选抗原,可以用来改进血清学检测方法。

[0006] 因此,筛选出以分泌抗WN10蛋白特异性抗体的杂交瘤细胞株,并鉴定出其所分泌的单克隆抗体所识别的WN10蛋白特异性B细胞表位多肽对旋毛虫病的诊断及预防具有积极意义,并为旋毛虫亚单位疫苗的研制奠定基础。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明提供一种WN10蛋白的B细胞表位多肽、杂交瘤细胞株、单克隆抗体及其应用。本发明获得了可以分泌抗Ts-WN10蛋白特异性抗体的杂交瘤细胞株,并鉴定出其所分泌的单克隆抗体所识别的Ts-WN10蛋白特异性B细胞表位多肽,对旋毛虫病的诊断具有重要意义,对建立竞争ELISA和循环抗原的检测的夹心ELSIA用于旋毛虫多宿主的检测及亚单位疫苗的研制具有重要的意义。

[0008] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0009] 本发明提供了WN10蛋白的B细胞表位多肽,其具有:

[0010] (I)、如SEQ ID No.1所示的氨基酸序列;或

[0011] (II)、如(I)所述的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或两个氨基酸残基获得的氨基酸序列,且与(I)所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列;或

[0012] (III)、与(I)或(II)所述序列具有至少90%序列一致性,且与(I)所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列。

[0013] 在上述研究的基础上,本发明还提供了编码如权利要求1所述的B细胞表位多肽的核苷酸,具有

[0014] (I)、如SEQ ID No.2所示的核苷酸序列;或

[0015] (II)、如SEQ ID No.2所示的核苷酸序列的互补核苷酸序列;或

[0016] (III)、与(I)或(II)的核苷酸序列编码相同蛋白质,但因遗传密码的简并性而与(I)或(II)的核苷酸序列不同的核苷酸序列;或

[0017] (IV)、与(I)、(II)或(III)所示的核苷酸序列经取代、缺失或添加一个或两个核苷酸序列获得的核苷酸序列,且与(I)、(II)或(III)所示的核苷酸序列功能相同或相似的核苷酸序列;或

[0018] (V)、与(I)、(II)、(III)或(IV)所述核苷酸序列具有至少90%序列一致性的核苷酸序列。

[0019] 此外,本发明还提供了一种包含所述的核苷酸的重组表达载体。

[0020] 本发明还提供了一种包含所述的核苷酸的重组菌株或细胞。

[0021] 在上述研究的基础上,本发明还提供了所述的B细胞表位多肽在制备旋毛虫感染的检测试剂、检测试剂盒中的应用。

[0022] 此外,本发明还提供了杂交瘤细胞株,其保藏编号为CGMCC No.18316。

[0023] 本发明还提供了单克隆抗体,选自:

[0024] (I)、通过保藏编号为CGMCC No.18316的杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体;

[0025] (II)、与能够结合由保藏编号为CGMCC No.18316的杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体的表位结合的单克隆抗体;

[0026] (III)、在竞争结合测定中与由保藏编号为CGMCC No.18316的杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体竞争的单克隆抗体;

[0027] (IV)、具有(I)~(III)任一项所述的单克隆抗体的抗原结合片段的单克隆抗体,其中所述片段保持特异性结合WN10蛋白或其变体的能力。

[0028] 本发明还提供了所述的杂交瘤细胞株或所述的单克隆抗体在制备旋毛虫感染的检测试剂、检测试剂盒中的应用。

[0029] 本发明还提供了用于旋毛虫感染的检测试剂或检测试剂盒,包括所述的杂交瘤细胞株或所述的单克隆抗体以及检测学上可接受的辅料。

[0030] 旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ES抗原是OIE及国际旋毛虫委员会规定的唯一的用于血清学抗体检测的标准抗原。然而ES抗原成分复杂,制备繁琐、生产周期长、批次质量不均,而且存在严重的诊断盲区(感染后19d前无法检出)和交叉反应等问题,因而阻碍了其实际应用。单克隆抗体具有与抗原结合的特异性强、纯度好、重复性强、便于质量控制、亲和力好且可大量生产优势,因而被广泛的应用于免疫学检测方法的建立。

[0031] 本发明获得了可以分泌抗Ts-WN10蛋白特异性抗体的杂交瘤细胞株,并鉴定出其所分泌的单克隆抗体所识别的Ts-WN10蛋白特异性B细胞表位多肽,对旋毛虫病的诊断具有重要意义,对建立竞争ELISA和循环抗原的检测的夹心ELISA用于旋毛虫多宿主的检测及亚单位疫苗的研制具有重要的意义。

[0032] 生物保藏说明

[0033] 生物材料:WN10-1H9;分类命名:杂交瘤细胞株;于2019年08月15日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC);保藏中心地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院3号;保藏编号为CGMCC No.18316。

附图说明

[0034] 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。

[0035] 图1示基因扩增结果;其中,M:DNA分子质量标准;1:Ts-WN10扩增产物;

[0036] 图2示Ts-WN10蛋白纯化后的SDS-PAGE结果;其中,M:蛋白分子质量标准;1-4:1-4批次纯化后Ts-WN10蛋白;

[0037] 图3示1H9单克隆抗体与猪旋毛虫感染阳性血清竞争结合Ts-WN10抗原;

[0038] 图4示抗Ts-WN10单克隆抗体对虫体可溶性抗原的Western blot分析;其中,M:蛋白分子质量标准;1:细胞培养液;2:1H9单抗;

[0039] 图5示Ts-WN10-A和Ts-WN10-B蛋白的SDS-PAGE分析;其中,M:蛋白质分子量标准;1:BL21-pET28a IPTG诱导后;2:BL21-pET28a-WN10 IPTG诱导后;3:BL21-pET28a-WN10-A IPTG诱导后;4:BL21-pET28a-WN10-B IPTG诱导后;

[0040] 图6示表达蛋白WN10-A和WN10-B的Western blot分析;其中,M:蛋白质分子量标准;1:表达蛋白WN10-B与1H9的Western blot分析;2:表达蛋白WN10-A与1H9的Western blot分析;3:表达蛋白WN10与1H9的Western blot分析;4.BL21-pET28a IPTG诱导后全菌与1H9的Western blot分析

[0041] 图7示Ts-WN10-A01和Ts-WN10-A02蛋白的SDS-PAGE分析;其中,M:蛋白质分子量标准;1:BL21-pET28a IPTG诱导后;2:BL21-pET28a-WN10-A01 IPTG诱导后;3:BL21-pET28a-WN10-A02 IPTG诱导后;

[0042] 图8示表达蛋白WN10-A01和WN10-A02的Western blot分析;其中,M:蛋白质分子量标准;1:BL21-pET28a诱导后与1H9的Western blot分析;2:表达蛋白WN10-A01与1H9的Western blot分析;3:表达蛋白WN10-A02与1H9的Western blot分析

[0043] 图9示合成短肽W1-W14的ELISA结果。

具体实施方式

[0044] 本发明公开了一种旋毛虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂的B细胞表位多肽、杂交瘤细胞株、单克隆抗体及其应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0045] 本发明目的之一是提供一株分泌抗Ts-WN10蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0046] 本发明目的之二是提供一种由上述杂交瘤细胞株所分泌的单克隆抗体,该单克隆抗体可与Ts-WN10蛋白发生特异性反应,并可以与猪感染旋毛虫阳性血清竞争识别重组的WN10抗原。

[0047] 本发明之三是鉴定一个Ts-WN10蛋白特异性B细胞表位多肽。

[0048] 本发明采用TRIZOL提取旋毛虫(*T. spiralis*)总RNA,进而利用反转录技术克隆WN10基因cDNA,将该cDNA插入原核表达载体pET28a,利用pET28a原核表达载体对Ts-WN10基因进行原核表达,将所表达出的包涵体形式的Ts-WN10蛋白切胶纯化后作为免疫原,免疫BALB/c小鼠,取其脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行融合。此外,本发明还采用AKTA蛋白纯化仪对Ts-WN10蛋白进行Ni柱一步柱上复性纯化,作为检测用抗原,建立间接ELISA检测方法对阳性杂交瘤细胞进行筛选。同时按照标准OIE Terrestrial Manual 2017 Chapter 2.1.20-Trichinellosis中推荐的ES间接ELISA方法对阳性杂交瘤细胞进行再次筛选,最终获得了一株稳定分泌抗Ts-WN10蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株,

[0049] 本发明还提供了一种由上述杂交瘤细胞株所分泌的单克隆抗体,其命名为:Ts-WN10-1H9,Ts-WN10竞争ELISA检测结果表明,单克隆抗体Ts-WN10-1H9可以与旋毛虫感染阳性猪血清竞争结合Ts-WN10蛋白。Western blot试验结果表明,本发明所制备的单克隆抗体能与旋毛虫(*T. spiralis*)肌幼虫可溶性抗原发生特异性反应。

[0050] 本发明利用肽扫描技术对Ts-WN10-1H9所识别的Ts-WN10蛋白B细胞表位进行了鉴定,确定Ts-WN10-1H9识别表位⁹⁹VNCQGEGRRKHCTME¹¹³(如SEQ ID No.1所示)。

[0051] 其核苷酸序列为:GTTAATTGTCAAGGAGAAGGCCGACGAAAGCATTGTACAATGGAA(如SEQ ID No.2所示)。

[0052] 因此,本发明提出了所述的杂交瘤细胞株在研制旋毛虫(*T. spiralis*)感染检测中的应用。及所述Ts-WN10蛋白B细胞表位多肽在研制旋毛虫(*T. spiralis*)感染检测中的应用。

[0053] 综上所述,本发明制备并鉴定出了一种针对Ts-WN10蛋白的单克隆抗体,本发明的单克隆抗体以及该单克隆抗体所识别的Ts-WN10蛋白B细胞表位多肽可用于制备成诊断旋毛虫(*T. spiralis*)感染的试剂,为建立旋毛虫(*T. spiralis*)血清学诊断方法奠定了基础。

[0054] 本发明提供的WN10蛋白的B细胞表位多肽、杂交瘤细胞株、单克隆抗体及其应用中所用原料及试剂均可由市场购得。

[0055] 主要实验材料和来源

[0056] 1. 蛋白、细胞、虫种

[0057] 原核表达并切胶纯化的Ts-WN10蛋白、原核表达并一步柱上复性纯化的Ts-WN10蛋

白、SP2/0细胞和旋毛虫T1 (*T. spiralis*) 虫种均由本实验室保存。

[0058] 2. 主要试剂和药品

[0059] Ni纯化柱HisTrapHP购自美国GE公司;胎牛血清、1640培养基购自Biological Industries公司;HAT培养基(50×)、HT培养基(50×)和抗体亚类鉴定试剂盒购自sigma公司;Soluble TMB substrate Solution购自TIANGEN公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠IgG抗体购自北京博奥森公司;预染蛋白Marker购自Fermentas公司;限制性内切酶EcoRI和XhoI、反转录酶、Ex Taq DNA聚合酶、T4DNA连接酶购自宝生物(大连)有限公司。ECL发光底物购自北京索莱宝公司。

[0060] 3. 实验动物

[0061] 6周龄BALB/c小鼠由长春亿斯实验动物技术有限公司提供。

[0062] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0063] 实施例1Ts-WN10蛋白的原核表达及纯化

[0064] 1. 引物设计

[0065] 根据Genbank中已登录的TsWN10基因序列(登录号:EU263325),设计PCR扩增引物,序列如下:

[0066] TsWN10-EcoRI-atg:5'-TAACGAATTCATGCAGATACTTGGTGA-3' (如SEQ ID No.3所示)

[0067] TsWN10-XhoI-tta:5'-GACGCTCGAGTTAACATTCAACA-3' (如SEQ ID No.4所示)

[0068] 下划线部分为引入的EcoRI、XhoI酶切位点,预计扩增产物长度为1187bp。

[0069] 2. 旋毛虫T1 (*T. spiralis*) RNA的提取及反转录

[0070] 取本实验旋毛虫T1 (*T. spiralis*) 保种小鼠1只,断颈处死后去皮、尾、内脏及爪,将胴体洗净后绞碎,置于300ml含有1%HC1和1%胃蛋白酶的消化液中于37℃温箱内搅拌消化2h。用80目滤网过滤消化液及残渣,滤液于分液漏斗中沉淀2h后收集约500ml。沉淀30min后用20ml注射器轻轻吸去上层液体,加入生理盐水再次沉淀,弃上清,反复洗涤至无杂质。将虫体移至EP管中,1000rpm离心3min吸去多余液体。收获的虫体加入1ml Trizol混匀,室温静置5min,加入0.2ml氯仿,用力振摇15s,室温孵育2-3min,12000g 4℃离心15min,小心取上层液体,加入等体积预冷的异丙醇,混匀后室温孵育10min,12000g 4℃离心10min,弃上清,沉淀加入1ml 75%乙醇(DEPC水配制)轻振15s,7500g 4℃离心5min,小心弃上清,沉淀室温风干3-5min,加入20-30ulDEPC水溶解,-20℃保存。

[0071] 用提取的总RNA进行反转录合成cDNA,体系如下:

	M-MLV 5× Reaction Buffer	5.0μl
	dNTP Mixture	1.0μl
[0072]	M-MLV RT	1.0μl
	RNAase inhibitor	0.5μl
	oligo dT ₁₈	1.0μl

[0073] NAase-free水至25μl,

[0074] 混匀后于42℃反应1h.-20℃保存。

[0075] 3. pET28a-Ts-WN10表达载体的构建

[0076] 以反转录获得的cDNA为模板扩增Ts-WN10基因。PCR反应体系(50ul)如下:

10×Ex Taq Buffer	5ul
10mM dNTPs	1ul
Ex Taq	0.5ul

[0077] 10pM 上游引物	2ul
10pM 下游引物	2ul
cDNA 模板	3ul
灭菌 ddH ₂ O	36.5ul

[0078] 反应条件为95℃预变性5min,95℃45s,53℃45s,72℃45s,循环30个,72℃终延伸10min。扩增产物经过1%琼脂糖凝胶电泳检测显示,在1161左右出现一条亮带(图1),与理论上目的条带的大小一致。测序结果显示成功得到了Ts-WN10蛋白的基因编码片段。对PCR产物胶回收。

[0079] Ts-WN10基因的克隆的结果表明(如图1所示),克隆得到Ts-WN10基因特异性引物扩增片段,去掉信号肽获得基因序列1161bp。

[0080] 将胶回收得到的Ts-WN10基因以及原核表达载体pET28a分别进行双酶切,酶切体系如下:

10×H Buffer	2ul
EcoRI	2ul
[0081] XhoI	2ul
WN10 基因	10ul
灭菌 ddH ₂ O	4ul

[0082] 同时,对原核表达载体pET28a进行双酶切,酶切体系如下:

10×H Buffer	2ul
EcoRI	2ul
[0083] XhoI	2ul
pET28a 载体	10ul
灭菌 ddH ₂ O	4ul

[0084] 将酶切反应体系置37℃水浴静置2h,之后进行胶回收。将双酶切后的WN10基因和pET28a载体进行连接,体系为:10×T4DNALigase Buffer 1ul,酶切后WN10基因4ul,酶切后pET28a1.5ul,T4DNA连接酶1ul,ddH₂O 2.5ul。16℃连接过夜。将连接产物全部转化EcoliDH5a感受态细胞,挑取单菌落进行双酶切鉴定。阳性重组质粒转化BL21 (DE3) 感受态细胞。

[0085] 4. BL21 (DE3) -pET28a-Ts-WN10诱导表达与切胶纯化

[0086] 取1ml重组菌液加入到100ml的LB培养基中37℃震荡培养至OD600nm约为0.5-1

时,加IPTG至终浓度为1mmol/L,37℃诱导6-8h。将表达产物进行SDS-PAGE电泳,通过切胶方法进行纯化。将切下的胶块加入适量的PBS将其研磨成碎颗粒,可用于免疫小鼠。

[0087] 5.BL21 (DE3) -pET28a-Ts-WN10诱导表达与一步柱上复性纯化。

[0088] 诱导后菌液离心后用30mL重悬缓冲液(20mM Tris-HCL PH8.0)重悬。冰浴10min,冰上超声,超声3s间歇3s共处理30min。8000rpm离心10min收沉淀,沉淀用30ml预冷的包涵体洗涤液(2M尿素、20mM Tris-HCL、0.3M NaCL PH8.0)重悬,冰浴10min,冰上超声,超声3s间歇3s共处理10min。此步骤重复3次。8000rpm离心10min收沉淀,沉淀用30ml预冷的PBS洗涤液(含4M尿素的0.01M PBS)重悬,冰浴10min,冰上超声,超声3s间歇3s共处理5min。此步骤重复2次。8000rpm离心10min收沉淀,沉淀用5ml Binding buffer (8M尿素、20mM Tris-HCL、0.3M NaCL、5mM咪唑PH8.0)重悬,4℃溶解过夜。8000rpm离心30min收上清,上清过滤后准备上样。AKTA蛋白纯化仪柱上复性流程参考GE Healthcaare手册Purifying Challenging Proteins 77-79内容。纯化柱采用HisTrapHP 1ml。注射上样后柱上复性时间为2h。100%置换至Refolding buffer (20mM Tris-HCL、0.3M NaCL、5mM咪唑、1mM 2-巯基乙醇PH8.0)溶液后,更换至Elution buffer (20mM Tris-HCL、0.3M NaCL、500mM咪唑PH8.0)洗脱目的蛋白。重复4批次纯化实验。

[0089] Ts-WN10蛋白柱上复性紫外吸收图谱显示,100%置换至Refolding buffer后继续冲洗Refolding buffer溶液5个柱体积,出现明显洗脱峰。更换至Elution buffer后同样出现明显洗脱峰。SDS-PAGE结果显示两个峰值均为目的蛋白洗脱峰。重复4批次纯化实验,SDS-PAGE结果显示4次均获得了高度均一的可溶性目的蛋白。

[0090] SDS-PAGE可看到,纯化后的蛋白上清液只有一条清晰明显的条带,且大小与理论值相符图2,说明本研究获得了较纯的rTs-WN10可溶性蛋白。使用BCA蛋白定量试剂盒,对上述纯化的蛋白进行浓度测定,得出rTs-WN10蛋白的浓度为1-0.65mg/mL。

[0091] 实施例2抗Ts-WN10蛋白单克隆抗体的制备

[0092] 1. 小鼠免疫

[0093] 以切胶纯化的重组Ts-WN10蛋白免疫5只6周龄雌性BALB/c小鼠,共免疫5次,每次免疫间隔两周,免疫剂量为50ug/只,免疫途径为腹腔免疫。

[0094] 分别在4免和5免后1周对小鼠进行断尾采血,分离血清(4℃,3000rpm离心30min),用Ts-WN10间接ELISA方法检测抗体水平。Ts-WN10间接ELISA方法操作如下:柱上复性纯化后的Ts-WN10蛋白用包被液(0.01M NaOH PH12)稀释,包被量为0.125ug/孔,每孔100ul。于37℃包被2h或者4℃过夜。之后PBST(含0.05%吐温20)洗板3次。用封闭液(5%脱脂乳)37℃封闭2h。之后PBST洗板3次。待检血清倍比稀释(或者杂交瘤上清1:2倍稀释)后加入微孔板,每孔100ul。37℃孵育1h。之后PBST洗板3次。羊抗鼠二抗1:1000倍稀释,与37℃孵育30min。之后PBST洗板4次。37℃显色10min。2M H₂SO₄终止反应,读取OD450nm处光吸收值。

[0095] 在细胞融合前3天,对免疫效果好的BALB/c小鼠进行加强免疫,每只小鼠腹腔注射50ug免疫原。

[0096] 2. 细胞融合

[0097] 融合前1天准备饲养层细胞,按照常规方法取BALB/c小鼠腹腔巨噬细胞铺于96孔细胞培养板中待用。断颈处死待取脾的小鼠,无菌取脾并分离脾细胞,按照脾细胞 1×10^8 与SP2/0骨髓瘤细胞 2.5×10^7 (4:1)的比例混合,用1ml PEG1000进行细胞融合,1min内滴加结

束。然后在1min内将预热至37℃的1ml 1640基础培养基滴加进细胞悬液中,边滴加边搅拌。进一步在3min内将预热至37℃的1ml 1640基础培养基滴加进细胞悬液中,边滴加边搅拌。最后将10ml 37℃的1640基础培养基缓慢的加入细胞悬液中。整个过程在37℃水浴中操作。1000r/min离心10min,弃上清,用HAT培养基重悬细胞,将细胞均匀的铺至预先铺有饲养细胞的96孔细胞培养板中,放置于37℃,5%CO₂培养箱中培养。

[0098] 3. 阳性杂交瘤细胞株的筛选及克隆

[0099] 利用Ts-WN10间接ELISA方法筛选阳性杂交瘤细胞株,对反应阳性的杂交瘤细胞进行扩大培养,同时用有限稀释法进行阳性杂交瘤细胞第1次亚克隆。参考OIE Terrestrial Manual 2017 Chapter 2.1.20-Trichinellosis所述ES间接ELISA方法再次筛选阳性杂交瘤细胞株,对反应阳性的杂交瘤细胞进行扩大培养,同时用有限稀释法进行阳性杂交瘤细胞的亚克隆,至少亚克隆3次,将亚克隆好的阳性杂交瘤细胞及时冻存。最终获得1株可以稳定分泌抗Ts-WN10蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其微生物保藏号是:18316;并将其分泌的单克隆抗体命名为Ts-WN10-1H9以下分别简称1H9。

[0100] 4. 腹水的制备

[0101] 给12周龄左右健康的BALB/c小鼠腹腔注射石蜡油,0.5ml/只,1周后腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞,7~10天后当小鼠腹腔极度膨胀时抽取腹水,隔2天抽取一次,将抽取的腹水10000rpm离心10min去除上层油脂和沉淀,上清分装保存于-20℃。

[0102] 实施例3单克隆抗体的鉴定

[0103] 1. 单克隆抗体的亚类鉴定

[0104] 按照抗体亚类鉴定试剂盒操作说明书对实施例2所得单克隆抗体进行亚类鉴定。结果显示本发明单克隆抗体的重链均为IgG1轻链为κ链,详见表1。

[0105] 表1单克隆抗体亚类鉴定

[0106]	单抗名称	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA	κ链	λ链
	WN10-1H9	0.837	0.062	0.045	0.048	0.031	0.046	0.757	0.039

[0107] 2. Ts-WN10竞争ELISA试验

[0108] 包被封闭同Ts-WN10间接ELISA,从1:1开始2倍倍比稀释猪旋毛虫感染阳性和阴性血清,稀释后的待检血清各取50ul分别与单抗上清50ul等体积混合,取混合后溶液100ul加入微孔板,37℃作用1h,之后同间接ELISA,分析单抗上清能否与猪旋毛虫感染阳性血清竞争结合Ts-WN10蛋白。

[0109] 试验结果证实,本发明所制备的单克隆抗体能够与猪旋毛虫感染阳性血清竞争结合Ts-WN10蛋白,详见表2、图3。从图3可以看出,单抗的P/N值随着旋毛虫阴阳性血清稀释度的增大而增大,说明旋毛虫阳性血清能够阻断单抗上清。因此单抗为检测猪血清的竞争抗体。

[0110] 表2 1H9单克隆抗体与猪旋毛虫感染阳性血清竞争结合Ts-WN10抗原

WN10-1H9 单抗组	质控血清稀释倍数					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
阳性质控血清 OD450nm 吸光度 (P)	0.3470	0.3065	0.2700	0.3480	0.5680	0.7685
阴性质控血清 OD450nm 吸光度 (N)	0.9380	0.8650	0.7525	0.7590	0.9080	0.9775
P/N 值	0.36993 6	0.35433 5	0.35880 4	0.45849 8	0.62555 1	0.78618 9

[0112] 3. Western blot 试验

[0113] 将旋毛虫肌幼虫用 ddH₂O 洗涤 3 次, 加入少量 ddH₂O, 在冰浴中以组织研磨器研磨虫体至碎片, 再于冰浴中用超声波细胞粉碎仪破碎虫体碎片。电压 300V, 超声 5s 间隔 9s, 工作 5 次, 超声 3 个循环, 光镜下观察虫体已粉碎成较小碎片时, 置 4℃ 和 -20℃ 交替冻融 5 次, 冻融后的虫体 4℃ 1600g 离心 30min, 吸取上清即为可溶性抗原。处理后进行 SDS-PAGE, 然后经电转印将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂乳 4℃ 封闭过夜, 加入单克隆抗体室温孵育 1h, 用 PBST 洗涤 3 次, 再与 3000 倍稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体室温孵育 1h, PBST 洗涤 3 次后, 用 ECL 发光底物显色。细胞培养液为阴性对照。

[0114] 试验结果证实, 单抗能结合虫体可溶性抗原, 所识别的大小, 与 WN10 所一致, 表明所获得的单克隆抗体可以识别天然的 WN10 抗原。本发明所制备的单克隆抗体 1H9 能与旋毛虫 (*T. spiralis*) 肌幼虫可溶性抗原发生特异性反应 (图 4)。

[0115] 实施例 4 B 细胞表位多肽的鉴定

[0116] 1. Ts-WN10 蛋白的第一轮分段截短表达

[0117] 以重组质粒 pET28a-WN10 的基因序列为模板, 设计 2 对引物,

[0118] TsWN10-A-EcoRI-atg: 5' -TAACGAATTCATGCAGATACTTGGTGA-3' (如 SEQ ID No.5 所示)

[0119] TsWN10-A-XhoI-tta: 5' -GACGCTCGAGTTAATTCACCCTT-3' (如 SEQ ID No.6 所示)

[0120] TsWN10-B-EcoRI-atg: 5' -TAACGAATTCATGCGTGTCCTAAAGG-3' (如 SEQ ID No.7 所示)

[0121] TsWN10-B-XhoI-tta: 5' -GACGCTCGAGTTAATTCATTCAACA-3' (如 SEQ ID No.8 所示)

[0122] 经 PCR 扩增后将他们分别连接到 pET28a 上构建重组质粒, 分别命名为 pET28a-WN10-A 和 pET28a-WN10-B, 对含有 pET28a-WN10-A 和 pET28a-WN10-B 的重组菌液分别进行诱导表达按实施例 1 中“4.”的方法, 并对其进行 SDS-PAGE 电泳分析, 确定短肽表达成功。两段蛋白处理后进行 SDS-PAGE, 按照实施例 3 的方法将他们与单克隆抗体进行 Western blot 试验。试验结果表明单克隆抗体所针对的 B 细胞表位位于 pET28a-WN10-A 分段蛋白上 (图 5 和图 6)。

[0123] 2. Ts-WN10 蛋白的第二轮分段截短表达

[0124] 以重组质粒 pET28a-WN10-A 的基因序列为模板, 设计 2 对引物, 经 PCR 扩增后按实施例 1 的方法将他们分别连接到 pET28a 上构建重组质粒, 分别命名为 pET28a-WN10-A01 和 pET28a-WN10-A02, 按照实施例 1 的方法对其进行诱导表达后, SDS-PAGE 电泳分析, 确定短肽

表达成功。蛋白处理后进行SDS-PAGE,按照实施例3的方法将他们分别与单克隆抗体进行Western blot试验。试验结果表明单克隆抗体所针对的B细胞表位位于pET28a-WN10-A01分段蛋白上(图7和图8)。

[0125] TsWN10-A01-EcoRI-atg:5'-TAACGAATTCATGCAGATACTTG-3' (如SEQ ID No.9所示)

[0126] TsWN10-A01-XhoI-tta:5'-GACGCTCGAGTTAAGCATTTGAA-3' (如SEQ ID No.10所示)

[0127] TsWN10-A02-EcoRI-atg:5'-TAACGAATTCATGATTGATTCAAATGC-3' (如SEQ ID No.11所示)

[0128] TsWN10-A02-XhoI-tta:5'-GACGCTCGAGTTAATTCACCCTT-3' (如SEQ ID No.12所示)

[0129] SDS-PAGE分析表明2个蛋白均获得成功表达。经Western blot鉴定,1H9单抗与Ts-WN10-A01产生特异性反应,且反应性较强。

[0130] 3.单克隆抗体抗原表位的鉴定

[0131] 应用生物学软件DNASTar对WN10进行亲水性、抗原性预测,同时利用表位预测程序ABCpred和Bepipred进行表位预测,利用PepScan技术合成14个短肽,再进行间接ELISA试验检测,包被量为0.25ug/孔。结果显示1H9与Ts-WN10-W2发生特异性反应,结合Western blot结果推断1H9所识别的Ts-WN10蛋白B细胞表位初步定位于⁹⁹VNCQGEGRRKHCTME¹¹³所示氨基酸序列上。

[0132] 表3合成短肽

	短肽	序列
[0133]	W1	ALFSSDLKQESGVFH
	W2	VNCQGEGRRKHCTME
	W3	TMEYTHRNPSKATVS
[0134]	W4	TVSKCFEEVEEPLII
	W5	QILGETTHYGRNDP
	W6	ALFSSDSKEQSGVLH
	W7	HKLVELESSTMGIL
	W8	CTLEYRHRTPSTATV
	W9	EEQVVSQRSQMLGGT
	W10	IFESDKKKSSGTYLL
	W11	KETECGIKEKAFNSY
	W12	EKAFNSYEDVYKNCS
	W13	DVYKNCSGSGDSKVC
	W14	VEYKYFDPTKSTVEC

[0135] 表4

[0136]

组别 (OD450nm 吸光度)	合成短肽						
	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7
WN10-1H9	0.0733	1.1533	0.1487	0.1714	0.2860	0.1273	0.1616
组别 (OD450nm 吸光度)	合成短肽						
	W8	W9	W10	W11	W12	W13	W14
WN10-1H9	0.1516	0.1441	0.1610	0.1470	0.1600	0.1663	0.1581

[0137] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 吉林大学
- [0003] <120> 旋毛虫肠道期半胱氨酸蛋白酶抑制剂的B细胞表位多肽、杂交瘤细胞株、单克隆抗体、应用
- [0004] <130> MP1921704
- [0005] <160> 12
- [0006] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 15
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 识别表位 (Recognition epitope)
- [0011] <400> 1
- [0012] Val Asn Cys Gln Gly Glu Gly Arg Arg Lys His Cys Thr Met Glu
- [0013] 1 5 10 15
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 45
- [0016] <212> DNA
- [0017] <213> 识别表位 (Recognition epitope)
- [0018] <400> 2
- [0019] gttaattgtc aaggagaagg ccgacgaaag cattgtacaa tggaa 45
- [0020] <210> 3
- [0021] <211> 27
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0024] <400> 3
- [0025] taacgaattc atgcagatac ttggtga 27
- [0026] <210> 4
- [0027] <211> 23
- [0028] <212> DNA
- [0029] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0030] <400> 4
- [0031] gacgctcgag ttaacattca aca 23
- [0032] <210> 5
- [0033] <211> 27
- [0034] <212> DNA
- [0035] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0036] <400> 5
- [0037] taacgaattc atgcagatac ttggtga 27

[0038]	<210> 6
[0039]	<211> 23
[0040]	<212> DNA
[0041]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0042]	<400> 6
[0043]	gacgctcgag ttaattcacc ctt 23
[0044]	<210> 7
[0045]	<211> 25
[0046]	<212> DNA
[0047]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0048]	<400> 7
[0049]	taacgaattc atgcgtgtcc aaagg 25
[0050]	<210> 8
[0051]	<211> 23
[0052]	<212> DNA
[0053]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0054]	<400> 8
[0055]	gacgctcgag ttaacattca aca 23
[0056]	<210> 9
[0057]	<211> 23
[0058]	<212> DNA
[0059]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0060]	<400> 9
[0061]	taacgaattc atgcagatac ttg 23
[0062]	<210> 10
[0063]	<211> 23
[0064]	<212> DNA
[0065]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0066]	<400> 10
[0067]	gacgctcgag ttaagcattt gaa 23
[0068]	<210> 11
[0069]	<211> 27
[0070]	<212> DNA
[0071]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0072]	<400> 11
[0073]	taacgaattc atgattgatt caaatgc 27
[0074]	<210> 12
[0075]	<211> 23
[0076]	<212> DNA

-
- [0077] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0078] <400> 12
- [0079] gacgctcgag ttaattcacc ctt 23



图1

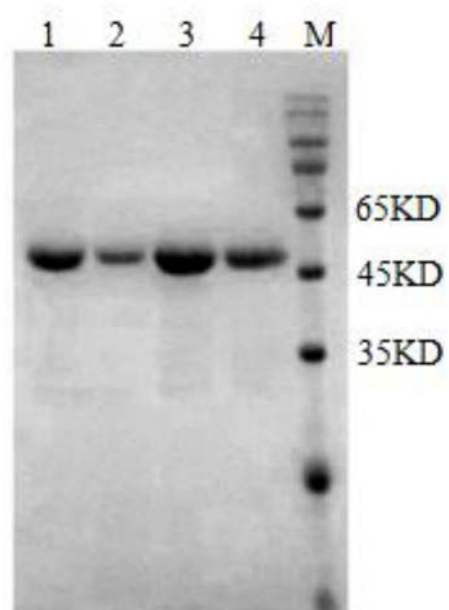


图2

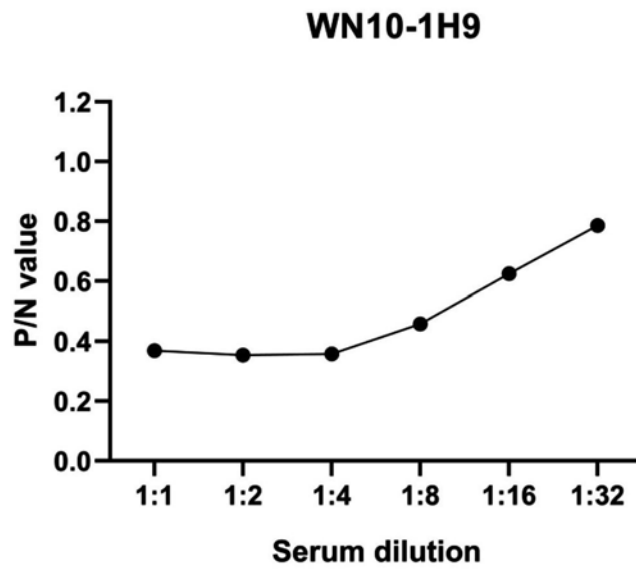


图3

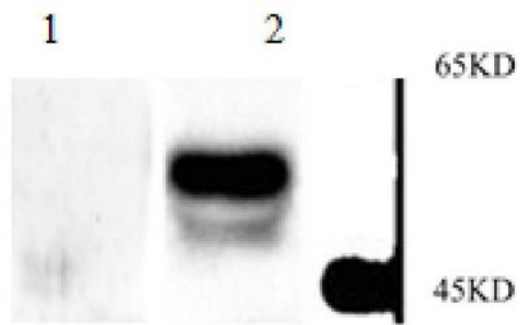


图4

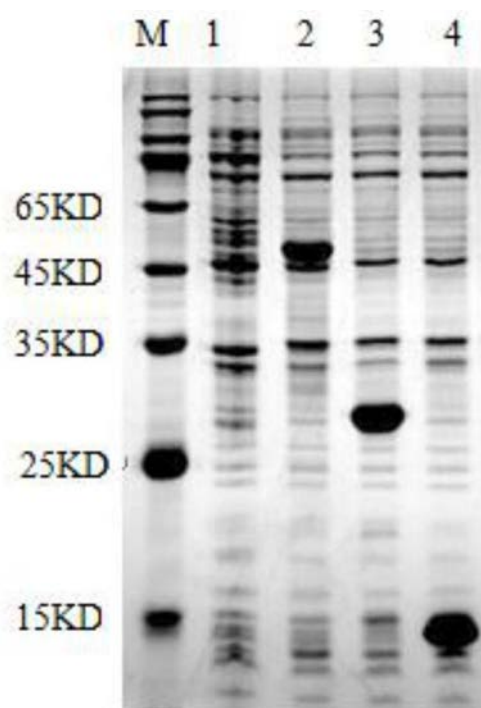


图5

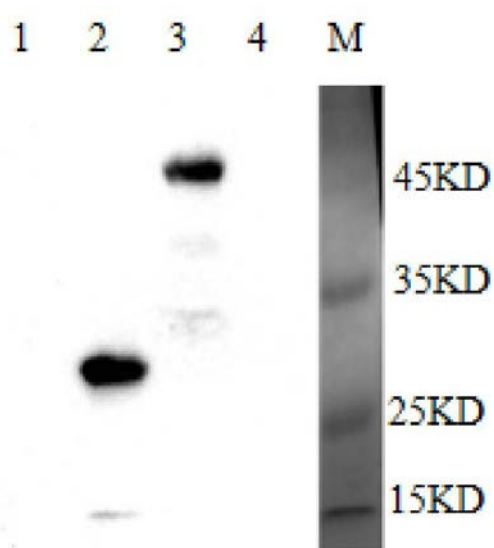


图6

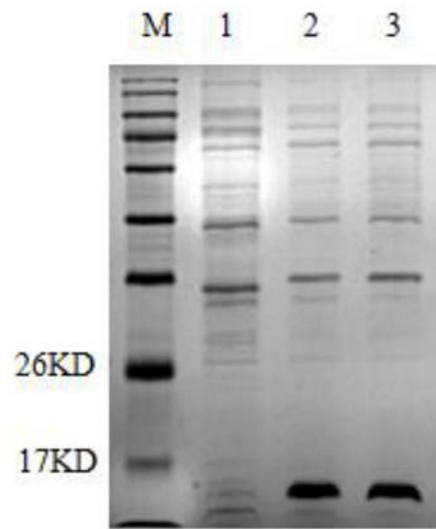


图7

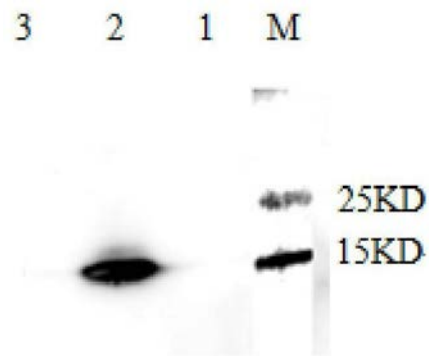


图8

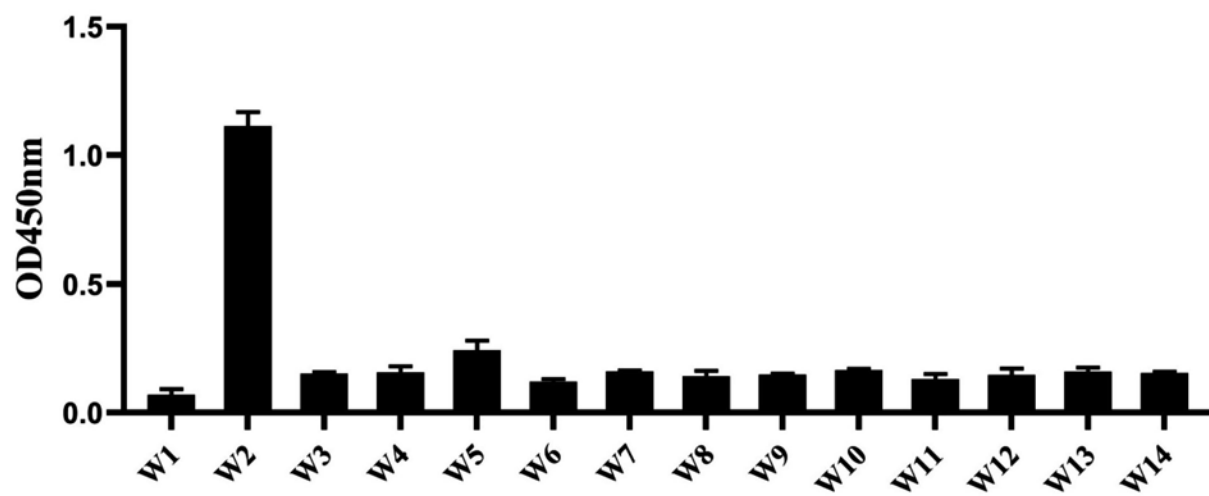
WN10-1H9

图9